



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
CAMPUS DIADEMA

LAISSA SOARES RAFAEL

Estudos sobre a produção biogênica de metano em sedimento  
marinho próximo à Geleira Wanda, Ilha Rei George, Península Antártica

DIADEMA

2018

LAISSA SOARES RAFAEL

Estudos sobre a produção biogênica de metano em sedimento  
marinho próximo à Geleira Wanda, Ilha Rei George, Península Antártica

Dissertação apresentada como  
exigência parcial para obtenção  
do título de Mestre em Ciências  
ao Programa de Pós-Graduação  
Análise Ambiental da  
Universidade Federal de São  
Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina  
Rossi Nakayama

DIADEMA

2018



Rafael, Laissa Soares  
Estudos sobre a produção biogênica de metano em sedimento  
marinho próximo à Geleira Wanda, Ilha Rei George, Península Antártica  
/ Laissa Soares Rafael. - - Diadema, 2018.  
154 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-  
Graduação em Análise Ambiental Integrada) - Universidade  
Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2018.

Orientador: Cristina Rossi Nakayama

1. Cultivo. 2. Archaea. 3. Metano. 4. Sedimento marinho. 5.  
Antártica I. Título.

CDD 579.321

## **LAISSA SOARES RAFAEL**

Estudos sobre a produção biogênica de metano em sedimento marinho  
próximo à Geleira Wanda, Ilha Rei George, Península Antártica

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Dissertação apresentada como  
exigência parcial para obtenção  
do título de Mestre em Ciências  
ao Programa de Pós-Graduação  
Análise Ambiental da  
Universidade Federal de São  
Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina  
Rossi Nakayama

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Rossi Nakayama**  
Orientadora  
Professora Adjunta - Universidade  
Federal de São Paulo, Campus  
Diadema

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Maia de Oliveira**  
Titular  
Pesquisador B - Universidade Estadual  
de Campinas (UNICAMP)

---

**Dr.<sup>a</sup> Amanda Gonçalves Bendia**  
Titular  
Pós-doutoranda - Universidade de São  
Paulo

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Talarico Saia**  
Titular  
Professora Adjunta - Universidade  
Federal de São Paulo, Campus  
Baixada Santista

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mércia Regina Domingues**  
Suplente  
Professora Adjunta - Universidade  
Federal do ABC

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Susan Pantaroto de  
Vasconcellos**  
Suplente  
Professora Adjunta - Universidade  
Federal de São Paulo, Campus  
Diadema

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivian Pellizari e a todos do LECOM por serem receptivos e me ajudarem em algumas etapas do trabalho, especialmente a Francielli e Natascha. Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de todos vocês.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Nakayama por todo suporte e paciência durante esses 5 anos.

Aos meus colegas de laboratório e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“You’re so brilliant, don’t soon forget.”

Stephen Christian.

## Resumo

A metanogênese ocorre em diversos ecossistemas antárticos. No sedimento marinho, a presença de compostos metilados derivados da síntese de osmolitos pode ser uma fonte de substratos metanogênicos. Na Península Antártica, geleiras vêm sofrendo retração em função das mudanças climáticas, expondo o solo e alterando as dinâmicas de circulação de nutrientes, impactando também a ecologia microbiana no seu entorno. O presente trabalho buscou estudar a diversidade cultivável de arqueias metanogênicas metilotróficas a partir de sedimento marinho das proximidades da geleira Wanda. Cultivos de enriquecimento em meio mineral salino com diferentes concentrações de trimetilamina (TMA) e metanol, sob atmosfera de  $\text{H}_2:\text{CO}_2$  ou  $\text{N}_2:\text{CO}_2$ , foram incubados a 20 °C, monitorados quanto à produção de metano por cromatografia gasosa (GC/FID) e caracterizados quanto à diversidade morfológica por microscopia de contraste de fase e fluorescência e à composição taxonômica através de sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq. Colônias foram obtidas e caracterizadas pela técnica de roll-tube. Culturas contendo TMA produziram mais metano em um menor período de tempo. Em algumas culturas a produção de metano foi maior na presença de hidrogênio. Os gêneros metanogênicos *Methanococcoides* e *Methanosarcina* foram detectados nas culturas, sendo observado predomínio de *Methanosarcina* nas culturas sob atmosfera de hidrogênio. Sequências de bactérias dos gêneros *Sedimentibacter*, *Desulfoconvexum*, *Desulfobacterium* e *Desulfobacula*, além de gêneros de bactérias não cultivadas também foram detectados. Nas culturas de roll-tube, os gêneros *Actinotalea* e *Rhodanobacter* foram predominantes, mas não foi possível obter isolados. Concluiu-se que a estratégia utilizada para enriquecer arqueias metanogênicas metilotróficas foi bem sucedida, sendo possível observar diferenças na produção de metano e na composição das comunidades em função dos substratos utilizados. A técnica de roll-tube não foi eficiente para o isolamento de culturas de arqueias metanogênicas, sendo necessárias adaptações. Os resultados indicam que o metabolismo metilotrófico é importante em sedimentos marinhos antárticos, possivelmente em função da disponibilidade dos substratos em ambientes marinhos e a não-competitividade com bactérias redutoras de sulfato.

**Palavras-chave:** Cultivo. Archaea. Metano. Sedimento marinho. Antártica.

## Abstract

Methanogenesis occurs in many antarctic ecosystems. In marine sediments, the presence of methylated compound derived of osmolytes can be a source of methanogenic substrates. In the Antarctic Peninsula, glaciers have been retreating due climate change, exposing the soil and modifying the nutrient circulation dynamics, also impacting the microbial ecology in its environment. The purpose of the present work was to study the cultivable diversity of methylotrophic methanogens from marine sediment collected on the vicinity of Wanda Glacier. Enrichment culture were made in artificial seawater media with different final concentration of trimethylamine (TMA) and methanol, under  $H_2:CO_2$  ou  $N_2:CO_2$  atmosphere at 20 °C, cultures were monitored for methane production by gas chromatography (GC), cell morphology described by phase contrast and fluorescence microscopy and taxonomic composition was investigated through Illumina MiSeq sequencing. Colonies were obtained through roll-tube. Cultures with TMA produced more methane in a short period of incubation. In some cultures methane production was higher in the presence of hydrogen. The methanogenic genus *Methanococcoides* and *Methanosarcina* were observed in cultures, there was a predominance of *Methanosarcina* in cultures under hydrogen atmosphere.. Sequencing of bacteria from the genera *Sedimentibacter*, *Desulfoconvexum*, *Desulfobacterium* and *Desulfobacula*, besides uncultured bacterial genera. In roll-tube the genus *Actinotalea* e *Rhodanobacter* were predominant, but it wasn't possible to obtain isolates. It was concluded that the strategy used to enrich methylotrophic methanogenic archaea was successful and it was also possible to observe differences in methane production and in the composition of the communities according to the substrates used. The roll-tube technique was not efficient for the isolation of cultures of methanogenic archaea, adaptations will be necessary. The results indicate that methylotrophic metabolism is important in Antarctic marine sediments, possibly due to the availability of substrates in marine environments and non-competitiveness with sulfate reducing bacteria.

**Key-words:** Cultivation. Archaea. Methane. Marine sediment. Antarctic.

### Lista de siglas e abreviações

DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (eletroforese em gel com gradiente de desnaturação)
DNA	Ácidodesoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F <sub>420</sub>	Fator 420
FISH	Fluorescence in situ Hybridization (Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> )
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
rRNA	RNA ribossômico
TMA	Trimetilamina

## Lista de figuras

Figura 1. Localização a geleira Wanda (em vermelho). .....	26
Figura 2. Atual filogenia sugerida do Domínio Archaea.....	29
Figura 3. Representação esquemática dos ciclos do (a) carbono, (b) nitrogênio e (c) enxofre. As setas em laranja representam processos realizados exclusivamente por arqueias; as setas em vermelho indicam processos realizados por arqueias e bactérias e as setas cinzas indicam processos realizados exclusivamente por bactérias. ....	30
Figura 4. Vias de produção de metano. As setas pretas cheias referem-se à via hidrogenotrófica, as setas pretas tracejadas referem-se à via metilotrófica e as setas cinzas à via acetoclástica. Legenda: MFR: Metanofurano; H4MPT: tetrahidrometanopterin; HS-CoM: Coenzima M; HS-CoB: Coenzima B.....	34
Figura 5. Desenho experimental. ....	45
Figura 6. Sequência de repiques realizados a partir das culturas de enriquecimento. Em vermelho são as culturas iniciais; em azul o primeiro repique (R1); em laranja o segundo repique (R2) e em verde o terceiro repique (R3).....	48
Figura 7. Abundância relativa dos filos de bactérias e arqueias presentes na amostra de sedimento coletada próximo à geleira Wanda.....	57
Figura 8. Abundância relativa das classes de bactérias e arqueias presentes na amostra de sedimento coletada próximo à geleira Wanda.....	59
Figura 9. Produção de metano pelas culturas de enriquecimento inicial 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> ) em azul e enriquecimento inicial 2 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA e as setas roxas indicam o momento de retirada de amostra para inóculo em roll-tube. A cor do contorno da	



seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas. ....60

Figura 10. Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 596 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo comprido sob contraste de fase. (B) (I) Par de bacilo; (II) bacilo escuro e (III) coco escuro sob contraste de fase. ....61

Figura 11. Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 692 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Dois pares de bacilos sob contraste de fase. (B) Sob luz UV, indicando que as morfologias presentes não são fluorescentes. ....62

Figura 12. Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 2 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 692 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) Cocos sob contraste de fase. (B) Cocos fluorescendo sob luz UV. ....62

Figura 13. Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 2 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 729 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo; (II) Bacilo com flagelo; (III) Coco; (IV) Diplobacilo sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo; (II) Bacilo com flagelo e (V) Diplobacilo; fluorescendo sob luz UV. ....63

Figura 14. Produção de metano pelas culturas 7 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 8 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas. ....65

Figura 15. Morfologias presentes na cultura 7 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 551 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro. (B) (I) Coco escuros e (II) Célula esférica translúcida. (C)

(I) Par de cocos irregulares e (II) Célula esférica translúcida sob contraste de fase.  
 (D) (I) Células esféricas translúcidas; sob contraste de fase. ....66

Figura 16. Morfologias presentes na cultura 7 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 610 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro sob contraste de fase. (B) (I) Diplobacilo escuro fluorescendo sob luz UV. ....67

Figura 17. Morfologias presentes na cultura 8 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 551 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo fino. (II) Bacilo escuro e (III) Bacilo fino com grânulo. (B) (I) Estreptococo; (II) Bacilo fino e (III) Coco escuro; (C) (I) Coco escuro; (II) Bacilo fino e (III) Diplobacilo. (D) (I) Bacilo com flagelo; (II) Diplobacilo escuro e (III) Bacilos escuros; sob contraste de fase.....68

Figura 18. Morfologias presentes na cultura 8 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 610 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos; (I) Coco. (B) (I) Bacilo e (II) Coco fluorescendo sob luz UV. .69

Figura 19. Produção de metano pelas culturas 3 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 4 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.....70

Figura 20. Morfologias presentes na cultura 3 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 540 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro (B) (I) Coco escuro e (II) Bacilo; sob contraste de fase. 71

Figura 21. Morfologias presentes na cultura 3 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 660 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo e diversos cocos escuros sob contraste de fase. (B) Sob luz UV, indicando que as morfologias presentes não são fluorescentes.....71

Figura 22. Morfologias presentes na cultura 4 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 540 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo. (II) Pares de bacilos; (III) Bacilo fino. (IV) Bacilos escuros; (V) Bacilo fino com grânulo e (VI) Bacilo com flagelo. (B) (I) Coco escuro; (II) Diplobacilo; (III) Bacilo com flagelo e (IV) Bacilo escuro; sob contraste de fase.72

Figura 23. Morfologias presentes na cultura 4 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 660 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo sob contraste de fase. (B) (I) Estreptobacilo fluorescendo sob UV.....72

Figura 24. Produção de metano pelas culturas 5 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 9 (20 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA e a seta roxa indica o momento de retirada de amostra para inóculo em roll-tube. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas. ....73

Figura 25. Morfologias presentes na cultura 5 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 610 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo escuro; (II) Diplobacilo; (III) Coco escuro e (IV) Diplobacilo. (B) (I) Bacilos escuros e (II) coco escuro; sob contraste de fase. ....74

Figura 26. Morfologias presentes na cultura 5 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 660 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I); (II) Bacilo escuro e (III) Células esféricas translúcidas; sob contraste de fase. (B) (I) e (II) Bacilos escuros fluorescendo sob UV.....74

Figura 27. Morfologias presentes na cultura de 9 (20 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 636 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) e (II) Bacilos com “espaços” em diferentes posições. (B) (I) Coco escuro; (II) e (II) Bacilo com “espaço”. (C) (I) Bacilo escuro; (II) Bacilos com “espaços” em diferentes posições; (III) Bacilo escuro e (IV) Diplobacilo. (D) (I) Bacilo com “espaços” em diferentes posições; (II)

Bacilo; (III) Par de cocos e (IV) Bacilo escuro; sob contraste de fase.....75

Figura 28. Produção de metano pelas culturas 6 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 10 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.....77

Figura 29. Morfologias presentes na cultura 6 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 497 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo fino sob contraste de fase. (B) (I) ; (II) Estreptobacilos. (C) (I) Estreptobacilos e (D) (I) Bacilo grosso segmentado; (II) Bacilo com grânulos; sob contraste de fase. ....78

Figura 30. Morfologias presentes na cultura 6 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 556 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo sob contraste de fase. (B) (I) Estreptobacilo fluorescendo sob UV.....79

Figura 31. Morfologias presentes na cultura 10 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 582 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo escuro; (II) Par de bacilo; (III) Bacilo escuro e (IV) Coco escuro sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo escuro; (II) Par de bacilo; (III) Bacilo escuro e (IV) Coco escuro fluorescendo sob UV.....79

Figura 32. Abundância relativa dos filos de bactéria e arqueia presentes nas culturas 5, 7, 8 e 9.....85

Figura 33. Abundância relativa de gêneros de bactérias e arqueias presentes nas culturas 5, 7, 8 e 9. ....89

Figura 34. Morfologias presentes na cultura da colônia 1 da diluição 10<sup>-2</sup> da cultura 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 129 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Célula esférica translúcida; (II) Bacilo com

flagelo; (III) Bacilo e (IV) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Célula esférica translúcida; (II) Bacilo com flagelo; (III) Bacilo e (IV) Diplobacilo; fluorescendo sob UV. ....91

Figura 35. Morfologias presentes na cultura da colônia 1 da diluição 10-4 da cultura 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 77 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo com flagelo; (II) Bacilos agregados e (III) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo com flagelo; (II) Bacilos agregados e (III) Diplobacilo; fluorescendo sob UV. ....93

Figura 36. Exemplo de colônias sobrepostas (seta) observadas na diluição 10-4 da cultura 9 observadas na lupa. Aumento 20X.....93

Figura 37. Colônias da diluição 10-4 da cultura 2 observadas na lupa. Aumento 20X. (A) Colônia 1 e (B) Colônia 2.....94

Figura 38. Morfologias presentes na cultura da colônia 1 da diluição 10-4 da cultura 2 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 66 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo pequeno; (II) Bacilo comprido e (III) Estreptobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo pequeno; (II) Bacilo comprido e (III) Estreptobacilo; sob contraste de fase; fluorescendo sob UV. ....95

Figura 39. Colônias da diluição 10-4 da cultura 9 observadas na lupa. Aumento 20X. (A) Colônia 1 e (B) Colônia 2.....95

Figura 40. Morfologias presentes na cultura da colônia 2 da diluição 10-4 da cultura 9 (20 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 66 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) e (II) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) e (II) Diplobacilo ; sob contraste de fase; fluorescendo sob UV.....96

Figura 41. Abundância relativa dos filos de bactérias e arqueias presentes nas culturas das colônias obtidas no roll-tube da cultura 1 da diluição 10-4. ....98

Figura 42. Abundância relativa dos gêneros de bactérias e arqueias presentes nas culturas das colônias obtidas no roll-tube da cultura 1 da diluição 10-4. ....101

Figura 43. Produção de metano pelas culturas 15 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e enriquecimento inicial 16 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas. ....103

Figura 44. Morfologias presentes na cultura 16 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 474 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro com flagelo; (II) Célula esférica translúcida; (III) Coco escuro e (IV) Bacilo fino. (B) (I) Coco escuro; (II) Bacilo pequeno. (III) Bacilos escuros e (IV) Célula esférica translúcida; sob contraste de fase.....104

Figura 45. Morfologias presentes na cultura 16 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 591 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I); (II) Bacilos escuros e (III) Bacilo em espiral sob contraste de fase. (B) (I); (II) Bacilos escuros e (III) Bacilo em espiral fluorescendo sob UV.....104

Figura 46. Produção de metano pelas culturas 11 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e enriquecimento inicial 12 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.. ....105

Figura 47. Morfologias presentes na cultura 11 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 504 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro e (II) Estreptobacilos escuros. (B) (I); (II) e (III) Bacilos escuros; sob contraste de fase. ....106

Figura 48. Morfologias presentes na cultura 11 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 584 dias de incubação. Aumento

1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro; (II) Bacilo com grânulos; (III) Diplobacilo escuro; (IV) Bacilo reto e (V) Estreptococo; sob contraste de fase (B) (I) Diplobacilo escuro; (III) Diplobacilo escuro; (IV) Bacilo reto e (V) Estreptococo; fluorescendo sob UV.106

Figura 49. Produção de metano pelas culturas 13 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 17 (20 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia e as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas. ....107

Figura 50. Morfologias presentes na cultura 13 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 139 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo com “espaço”; (II) Bacilo fino; (III) Coco escuro e (IV) Bacilo com flagelo. (B) (I) e (II) Bacilos; sob contraste de fase. ....108

Figura 51. Morfologias presentes na cultura 13 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 279 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos escuros e (II) Diplobacilo; sob contraste de fase. (B) (I) Bacilos escuros e (II) Par de bacilo; fluorescendo sob UV.....108

Figura 52. Morfologias presentes na cultura 17 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos pequeno; (II) Coco escuro e (III) Bacilo comprido. (B) (I) Bacilo curvo com grânulos; (II) Bacilo escuro; (III) Bacilo com grânulos e (IV) Bacilo escuro. (C) (I) Coco escuro; (II) Bacilo pequeno. (III) Bacilo escuro; (IV) Estreptobacilo e (V) Bacilo escuro. (D) (I) Bacilo pequeno e (II) Bacilo com “espaço”; sob contraste de fase. ....109

Figura 53. Produção de metano pelas culturas 14 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 18 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia e as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as

culturas. ....110

Figura 54. Morfologias presentes na cultura 14 (5 mM trimetilamina e 5 mM metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) aos 23 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo escuro. (B) (I) Coco escuro e (II) Diplobacilo escuro; sob contraste de fase. ....111

Figura 55. Morfologias presentes na cultura 14 (10 mM trimetilamina e 10 mM metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) aos 139 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro; (II) Diplobacilo escuro; (III) Estreptobacilo escuro; (IV) Diplobacilo escuro e (V) Bacilo escuro. (B) (I) Bacilo escuro; (II) Estreptobacilo escuro e (IV) Coco. (C) (I) Diplobacilo; (II) Estreptobacilo escuro; (III) Bacilo escuro e (IV) Bacilo fino com grânulos. (D) (I) Coco escuro e (II) Estreptobacilo escuro; sob contraste de fase. ....112

Figura 56. Morfologias presentes na cultura 18 (10 mM trimetilamina e 10 mM metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) aos 23 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo pequeno; (II) Bacilo escuro; (III) Bacilo com “espaço” e (IV) Coco escuro; (B) (I) Diplobacilo; (II) Bacilo com “espaço”; (III) Bacilo pequeno e (IV) Bacilo com grânulos; sob contraste de fase. ....113

Figura 57. Morfologias presentes na cultura 18 (10 mM trimetilamina e 10 mM metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) aos 322 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo com “espaço”; (II) Coco irregular; (III) Bacilo menor com “espaço”; (IV) Diplobacilo com “espaço” e grânulos; (V) Bacilo com “espaço” e grânulo e (VI) Bacilo com “espaço”; sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo com “espaço”; (II) Coco irregular; (IV) Diplobacilo com “espaço” e grânulos e (VI) Bacilo com “espaço”; fluorescendo sob UV. ....113

Figura 58. Produção de metano pelas culturas 23 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e I 24 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a



ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.....115

Figura 59. Morfologias presentes na cultura 23 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 275 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco; (II) Bacilo escuro e (III) Bacilo grosso segmentado. (B) (I) Bacilo fino e comprido; (II) Coco escuro e (III) Bacilo pequeno. (C) (I) Bacilo pequeno; (II) Diplococo e (III) Bacilo comprido segmentado. (D) (I) Bacilo escuro e (II) Bacilo fino e comprido; sob contraste de fase.....116

Figura 60. Morfologias presentes na cultura 23 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro e (II) Bacilo pequeno; (B) (I) Coco escuro; (II) Bacilo pequeno e (III) Diplobacilo escuro; sob contraste de fase.....117

Figura 61. Morfologias presentes na cultura 24 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 252 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo escuro; (II) Diplobacilo escuro e (III) Bacilo pequeno.(B) (I) Bacilo escuro e (III) Bacilo fino e comprido; sob contraste de fase.....117

Figura 62. Morfologias presentes na cultura 24 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 275 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco irregular; (II) Estreptobacilo escuro com grânulos e (III) Diplococo. (B) (I) Bacilo fino com grânulos; (II) Coco escuro; (III) Bacilo escuro e (IV) Bacilo com grânulo (C) (I) Diplobacilo com grânulos e (II) Coco irregular. (D) (I) Coco irregular e (II) Estreptobacilo com grânulos; sob contraste de fase.....118

Figura 63. Produção de metano pelas culturas 19 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 20 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. ....119

Figura 64. Morfologias presentes na cultura 19 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 303 dias de incubação. Aumento

1000x. (A) (I) Bacilo escuro; (II) Bacilo com “espaço”; (III); (IV) Diplobacilo escuro e (V) Bacilo com grânulo; sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo escuro; (IV) Diplobacilo escuro e (V) Bacilo com grânulo; fluorescendo sob UV. ....120

Figura 65. Morfologias presentes na cultura 19 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (I) Coco escuro; (II) Bacilo escuro e (III) Estreptobacilo escuro; sob contraste de fase (B) (I) Coco escuro; (II) Bacilo escuro e (III) Estreptobacilo escuro; fluorescendo sob UV.....120

Figura 66. Morfologias presentes na cultura 20 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 303 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos escuros; (II) Bacilo fino e comprido com grânulos; (III) Bacilos escuros; (IV) Células esféricas translúcidas e (V) Bacilo segmentado; sob contraste de fase (B) (I) e (III) Bacilos escuros; fluorescendo sob UV. ....121

Figura 67. Morfologias presentes na cultura 20 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro e (II) Bacilo escuro. (B) (I) Estreptobacilo escuro; (II) Bacilo fino e (III) Coco escuro; sob contraste de fase. ....121

Figura 68. Produção de metano pelas culturas 2A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul; 7A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde e 8A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em amarelo. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas. ....123

Figura 69. Morfologias presentes na cultura 2A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 14 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo curto; (II) Bacilo fino; (III) Bacilos curto; (IV) Diplobacilo e (V) Bacilo curto; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo curto; (II) Bacilo fino; (III) Bacilos curto; (IV) Diplobacilo e (V) Bacilo curto; fluorescendo sob UV. ....124

Figura 70. Morfologias presentes na cultura 7A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 19 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo curto; (II) Coco irregular; (III) Bacilo com “espaço”; (IV) Bacilos escuros e (V) Cocos irregulares; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo curto; (II) Coco irregular; (III) Bacilos com “espaço”; (IV) Bacilos escuros e (V) Cocos irregulares; fluorescendo sob UV. ....124

Figura 71. Morfologias presentes na cultura 8A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 19 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco irregular; (II) Bacilo curto; (III) Bacilo; (IV) Cocos irregulares e (V) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Coco irregular; (II) Bacilo curto; (III) Bacilo; (IV) Cocos irregulares e (V) Diplobacilo; fluorescendo sob UV. ....125

Figura 72. Abundância relativa dos filos de bactéria e arqueia presentes nas culturas 2A, 7A e 8A.....126

Figura 73. Abundância relativa dos gêneros de bactéria e arqueia presentes nas culturas 2A, 7A e 8A. ....128

## Lista de tabelas

Tabela 1. Gêneros de arqueias metanogênicas metilotróficas e principais características. ....	37
Tabela 2. Composição da água do mar sintética modificada (KELLER, 1987). ....	47
Tabela 3. Resumo das amostras enviadas para sequenciamento relacionando o tempo de incubação e produção de metano. ....	51
Tabela 4. Cobertura dos primers utilizados no presente trabalho (515f/806r) e no trabalho de Pessi et al. (2015) (807f/1050r) para grupos taxonômicos de interesse, considerando “0 mismatch” e “1 mismatch”. Fonte: ARB PT - SILVA ( <a href="https://www.arb-silva.de/search/testprime/">https://www.arb-silva.de/search/testprime/</a> ) (LUDWIG et al., 2004). ....	55
Tabela 5. Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição 10-2 da cultura 1 e as morfologias observadas na microscopia.....	90
Tabela 6. Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição 10-4 da cultura 1.....	92
Tabela 7. Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição 10-4 da cultura 2.....	94
Tabela 8. Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição 10-4 da cultura 9.....	95

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Região de estudo: a geleira Wanda.....	25
2.2 O gás metano.....	27
2.3 Domínio Archaea.....	28
2.3.1 Arqueias metanogênicas .....	31
2.3.1.1 Metabolismo de arqueias metanogênicas .....	32
2.4 Métodos de estudo de ecologia microbiana aplicado às arqueias .....	38
2.4.1 Métodos dependentes de cultivo.....	38
2.4.2 Métodos independentes de cultivo .....	40
3. OBJETIVOS .....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
4.1 Coleta de amostra.....	43
4.2 Desenho experimental .....	43
4.3 Cultivo de enriquecimento.....	46
4.4 Isolamento por roll-tube .....	49
4.5 Extração de DNA.....	50
4.5.1 Extração de DNA de amostras de cultura e de amostra de sedimento.....	50
4.6 Análise de sequências .....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Sequenciamento de amostra de sedimento.....	52
5.2 Produção de metano e caracterização morfológica das culturas de enriquecimento inicial (culturas 1 e 2).....	59
5.3 Produção de metano e caracterização morfológica das culturas do repique 1 (R1).....	63
5.3.1 Repiques alimentados com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 7 e 8) .....	63
5.3.2 Repiques alimentados com 5 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 3 e 4) .....	69
5.3.3 Repiques alimentados com 10 mM e 20 mM de metanol, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 5 e 9) .....	72
5.3.4 Repiques alimentados com 5 mM e 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 6 e 10) .....	76
5.3.5 Análise de sequenciamento das culturas de enriquecimento inicial e das culturas selecionados do repique 1 (R1).....	80

5.4 Aplicação da técnica de roll-tube para obtenção de colônias (culturas 1, 2 e 9).....	89
5.4.1 Análise de sequenciamento das colônias do Roll-tube .....	96
5.5 Produção de metano e caracterização morfológica das culturas do repique 2 (R2).....	102
5.5.1 Repiques alimentados com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 15 e 16) .....	102
5.5.2 Repiques alimentados com 5 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 11 e 12) .....	104
5.5.3 Repiques alimentados com 10 mM e 20 mM de metanol, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 13 e 17) .....	106
5.5.4 Repiques alimentados com 5 mM e 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 14 e 18) .....	110
5.6 Produção de metano e caracterização morfológicas das culturas do repique 3 (R3) ...	114
5.6.1 Culturas alimentadas com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 23 e 24) .....	114
5.6.2 Culturas alimentadas com 5 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> e N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 19 e 20) .....	119
5.7 Repique das culturas selecionadas alimentadas com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> ou N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> (culturas 2A, 7A e 8A).....	122
5.7.1 Análise de sequenciamento das culturas selecionadas alimentadas com 10 mM de metanol e trimetilamina .....	125
6. CONCLUSÕES .....	129
7. REFERÊNCIAS .....	131
APÊNDICES .....	152
Apêndice A - Cálculo da concentração de metano na atmosfera do frasco de cultivo ..	152
ANEXOS .....	153
Anexo A - Composição da solução traço de metais.....	153
Anexo B - Composição da solução de vitaminas.....	154

## 1. INTRODUÇÃO

A Península Antártica é rica em ecossistemas microbianos e é também uma das regiões no planeta que apresentou um dos mais intensos aumentos de temperatura nas últimas décadas (IPCC, 2007). Na região costeira e na Antártica Marítima, a microbiota sofre grande influência da alternância das estações de inverno e verão, em função do rápido e efêmero aporte de água de degelo. A quebra do gelo marinho gera uma redução abrupta do albedo, resultando no aumento da temperatura e umidade do ar e no derretimento da neve. A combinação entre o efeito estufa, o aumento de precipitação e do fluxo de água de degelo acelera a transição entre a frigidez do inverno para condições de verão mais propícias à atividade microbiana em períodos curtos de até um dia (WYNN-WILLIAMS, 1996). Nesse processo, solutos e nutrientes, como ferro (HODSON et al., 2017) e material particulado (SAHADE et al., 2015) são transportados para o ambiente marinho, influenciando a produtividade primária e a diversidade marinha.

Dessa forma, as geleiras, sensíveis às alterações climáticas, podem ser consideradas um importante parâmetro para avaliar os efeitos dessas mudanças (HOPE et al., 1998). Segundo Rosa *et al.* (2014) a geleira Wanda, local de coleta de amostras do presente trabalho, responde rapidamente aos efeitos das mudanças climáticas, tendo retraído cerca de 0,64 km<sup>2</sup> desde 1956 (ARIGONY-NETO et al., 2006) como consequência do aumento de temperatura na região.

Os micro-organismos têm um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos dos elementos, como o ciclo do carbono, do qual o metano é um componente importante. O metano é um dos gases mais importantes do efeito estufa, juntamente com vapor d'água e gás carbônico. Entretanto, tem cerca de 28 vezes o valor do potencial de aquecimento do CO<sub>2</sub> em um horizonte de 100 anos (MYHRE et al., 2013). Além de ter importante papel no ciclo do carbono, o metano também altera o balanço radioativo e composição química da atmosfera da Terra, produzindo ozônio na troposfera e vapor d'água na estratosfera (USSIRI e RATTAN, 2017).

A produção biogênica de metano está essencialmente relacionada ao metabolismo de arqueias metanogênicas. As arqueias são micro-organismos procariotos pertencentes ao Domínio *Archaea*, que apesar de apresentarem características semelhantes a bactérias como tamanho e morfologia celular, diferem em outros aspectos, tais como a composição de membrana celular, processos de

transcrição de RNA e a via metabólica de produção de metano (GARCIA, PATEL e OLLIVIER, 2000).

As arqueias metanogênicas conseguem utilizar como substrato apenas compostos de no máximo dois carbonos e a produção de metano pode se dar através de três vias distintas, dependendo do tipo de substrato consumido: acetotrófica, hidrogenotrófica e metilotrófica (ZINDER, 1993). A via metilotrófica utiliza metanol ou compostos metilados como fonte de carbono.

Segundo Oremland e Polcin (1982) a utilização de metanol e compostos metilados por arqueias metanogênicas é uma vantagem ecológica pois são substratos não utilizados por bactérias redutoras de sulfato que normalmente competem com arqueias por acetato e hidrogênio. O metanol em sedimento marinhos é gerado como produto da degradação da pectina e lignina (DONNELLY e DAGLEY, 1980; SCHINK e ZEIKUS, 1982) e pode ser produzido pelo fitoplâncton (MINCER e AICHER, 2013), enquanto compostos metilados como a trimetilamina são produto de degradação da glicina-betaína ou colina, que servem como osmolitos em diversos procariotos halofílicos e algas (KING, 1984; ZHUANG et al., 2011).

Medidas de fluxo de metano na interface ar-água já foram realizadas em diferentes regiões da Antártica, indicando que o metano produzido no sedimento é emitido para a atmosfera (ZHU et al., 2009; NAKAYAMA et al., 2011).

Segundo Pessi *et al.* (2015), uma análise feita através de sequenciamento (Pirosequenciamento 454 da região hipervariável V5-V6) de amostras de solo coletadas na proximidade da geleira Wanda revelou a presença de 36 filos diferentes, dentre estes filos, os mais abundantes foram os filos de bactéria *Proteobacteria* (47,8%) e *Bacterioidetes* (18,5%) e, dentre as arqueias, o *Euryarchaeota* (10,0%), ao qual pertencem as arqueias metanogênicas.

Apesar de técnicas moleculares indicarem que as arqueias exercem importante papel ecológico na maior parte dos ecossistemas (CAVICCHIOLI, 2006), ainda existem lacunas entre a avaliação do potencial genômico e a funcionalidade de genes e proteínas (ZENGLER et al., 2002; GIOVANNONI e STINGL, 2007; CARDENAS e TIEDJE, 2008). Desse modo, é indispensável o estudo de micro-organismos associando métodos dependentes e independentes de cultivo, pois é possível consolidar informações acerca de sua funcionalidade nos ecossistemas (OREN, 2015).



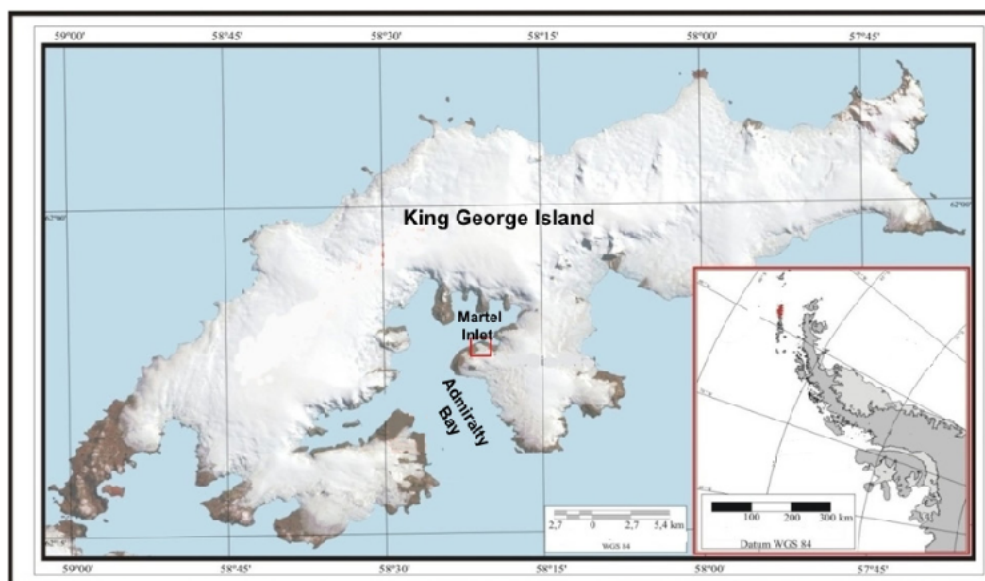
Nesse contexto, este trabalho pretende avaliar a resposta da comunidade metanogênica presente em sedimento marinho da área de influência da geleira Wanda a substratos metilados, considerando-se que podem ter relevância no ambiente antártico para a produção de metano, não apenas porque são substratos não competitivos, mas também porque há indícios de que essa categoria de compostos possa estar disponível como fontes naturais de carbono e energia para metanogênicas na Antártica. O trabalho faz parte do projeto “A vida microbiana na criosfera antártica: mudanças climáticas e bioprospecção (MICROSFERA)”, coordenado pela Dra. Vivian Helena Pellizari, no âmbito do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Região de estudo: a geleira Wanda**

A geleira Wanda (Figura 1) fica localizada na Ilha Rei George, Arquipélago das Ilhas Shetlands do Sul, Península Antártica. A geleira tem uma área de aproximadamente 1,56 km<sup>2</sup> (ROSA et al., 2009) e segundo estudos na região, a geleira perdeu aproximadamente 0,64 km<sup>2</sup> de área desde 1956 (ARIGONY-NETO et al., 2006) devido ao aumento de temperatura na região da Península Antártica. Esse aumento de temperatura ocasiona retração das frentes de gelo, mudanças no padrão de precipitação da região e redução do gelo marinho sazonal (ARIGONY-NETO et al., 2006), contribuindo, conseqüentemente, com a elevação do nível do mar.

**Figura 1.** Localização a geleira Wanda (em vermelho).



Fonte: ROSA *et al.*, 2015.

A Península Antártica apresenta condições difíceis para a sobrevivência de micro-organismos, tais como a baixa quantidade de nutrientes e água disponíveis, bem como as baixas temperaturas (PESSI *et al.*, 2012), mas ao mesmo tempo, é repleta de ecossistemas microbianos. Nos períodos de mudança de estações, especialmente inverno e verão, a comunidade microbiana sofre influência dessas alterações, como por exemplo a quebra do gelo marinho que leva à redução do albedo e consequentemente aumento da temperatura e umidade do ar, além do derretimento de neve. As mudanças causadas pelo efeito estufa juntamente com o aumento de precipitação e fluxo de água de degelo permite melhores condições à atividade microbiana em períodos curtos de até um dia (WYNN-WILLIAMS, 1996). Outro fator importante é a disponibilidade de minerais e nutrientes que no Oceano Antártico é influenciada tanto pela temperatura do oceano quanto pelas correntes, o que também afeta diretamente a composição das comunidades de micro-organismos, assim como seus processos desempenhados (CAVICCHIOLI, 2015). Alguns desses minerais, solutos e nutrientes como por exemplo o ferro (HODSON *et al.*, 2017) e material particulado (SAHADE *et al.*, 2015) ao serem transportados para o ambiente marinho influenciam a produtividade primária e consequentemente a diversidade marinha.

Estudos acerca da função de micro-organismos na Antártica podem contribuir para o entendimento de processos ecológicos, bem como prever os impactos das

mudanças climáticas neste ambiente, uma vez que a maior parte dos ecossistemas encontrados na Antártica são compostos exclusivamente por micro-organismos (PESSI et al., 2012).

A região da Península Antártica apresentou um aquecimento regional entre 2,5 e 3,0 °C nos últimos 64 anos; mais intenso quando comparado a outras regiões do planeta (IPCC, 2007; MONAGHAN et al., 2008).

As geleiras por serem sensíveis às mudanças climáticas, são consideradas importantes parâmetros para avaliar os efeitos dessas mudanças (HOPE et al., 1998). Segundo Rosa et al. (2014) a geleira Wanda responde rapidamente aos efeitos de mudanças climáticas, sendo relevante para estudos ambientais. A retração das geleiras permite exposição de solos que anteriormente estavam cobertos por gelo oferecendo, desse modo, novos nichos a serem ocupados (COOK et al., 2005; PESSI et al., 2015).

Segundo Pessi et al. (2015) há uma grande diversidade de micro-organismos nas proximidades da geleira Wanda e uma análise feita através de sequenciamento de amostras de solo revelou a presença de 36 filos diferentes. Dentre eles, os mais abundantes foram os filos de bactéria *Proteobacteria* (47,8%) e *Bacteroidetes* (18,5%) e, dentre as arqueias, houve predomínio do filo *Euryarchaeota* (10%), ao qual pertencem as arqueias metanogênicas.

## 2.2 O gás metano

A concentração de metano na atmosfera aumentou exponencialmente desde a Revolução Industrial ( $722 \pm 4$  ppb) até a década de 1980 (1650 ppb), quando o monitoramento sistemático de metano diretamente da atmosfera iniciou (USSIRI e RATTAN, 2017). O último dado referente à concentração de metano na atmosfera é do ano de 2015 e corresponde a  $1845 \pm 2$  ppb (WMO, 2016).

O metano é um dos mais importantes gases do efeito estufa e tem potencial de aquecimento global 28 vezes maior que o gás carbônico em um período de 100 anos (MYHRE et al., 2013). Um estudo calculou que a vida média do metano na atmosfera varia de  $9,8 \pm 1,6$  a  $11,2 \pm 1,3$  anos (DLUGOKENCKY et al., 2009; MYHRE et al., 2013).

As propriedades radioativas da atmosfera da Terra são influenciadas pelos gases do efeito estufa, especialmente pelo gás carbônico e metano (CIAIS et al., 2013). O metano atmosférico é primeiramente removido através de reações fotoquímicas, reagindo com radicais hidroxila, mas também pode sofrer reações com o cloro, especialmente próximo à superfície do oceano, onde cloro reativo pode ser produzido (SINGH et al., 1996; ALLAN, STRUTHERS e LOWE, 2007). Apesar do efeito estufa ser essencial à manutenção da temperatura da Terra, a alteração do balanço de metano e outros gases na atmosfera contribui para os efeitos das mudanças climáticas, como por exemplo aumento da temperatura da superfície terrestre (HARTMANN et al., 2013).

A produção de metano pode ter origem biótica ou abiótica. A origem abiótica está relacionada, em sua maior parte, à queima e extração de combustíveis fósseis, enquanto a origem biótica refere-se à produção de metano por arqueias metanogênicas. A produção biogênica de metano, por sua vez, pode ser classificada em fontes naturais e antrópicas (NEEF, VAN WEELE. e VAN VELTHOVEN, 2010).

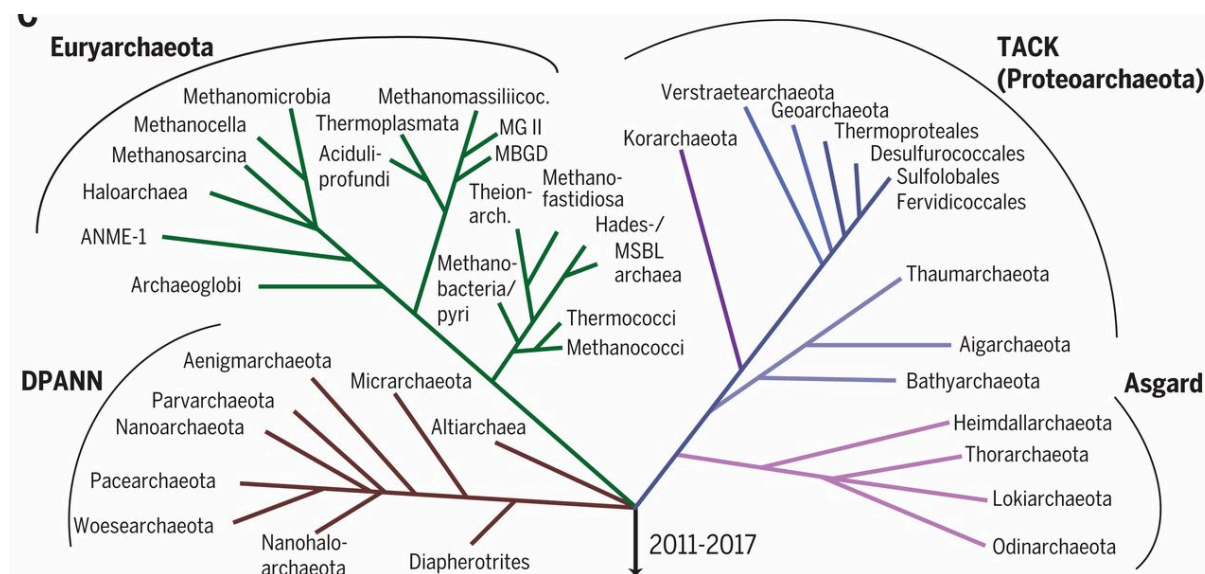
A produção de metano biogênico ocorre em diversos ambientes anóxicos (CHABAN, NG e JARRELL, 2006), como sedimentos marinhos, sedimentos de água doce, pântanos, fontes hidrotermais, vulcões e trato gastrointestinal de insetos como por exemplos os cupins (BRUNE, 1998). Já as fontes antrópicas estão associadas à produção de arroz (RAMAKRISHNAN et al., 2001), pecuária (WOLIN, 1981), estações de tratamento de esgotos e aterros sanitários (ZHU et al., 2009; CZEPIEL et al., 2003).

### **2.3 Domínio *Archaea***

As arqueias foram inicialmente classificadas como bactérias até que Woese propôs o Domínio *Archaea* na década de 1990. Dentre as características que diferenciam arqueias de bactérias estão a presença de alguns lipídios de membrana, os processos de transcrição de RNA, que acredita-se ser mais semelhante com o que é encontrado no Domínio *Eukarya* (GARRET e KLENK, 2007) e a própria via metabólica de produção de metano, que até o momento é conhecida por ser exclusiva de arqueias.

A atual classificação sugerida do Domínio *Archaea* (Figura 2) compreende três superfilos (TACK, Asgard e DPANN) e o filo *Euryarchaeota*. O superfilo TACK (ou *Proteoarchaeota*) (GUY e ETTEMA, 2011; PETITJEAN *et al.*, 2014) compreende os filos *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Korarchaeota* (BARNES *et al.*, 1996; ELKINS *et al.*, 2008), *Aigarchaeota* (NUNORA *et al.*, 2011), *Geoarchaeota* (KOZUBAL *et al.*, 2013), *Bathyarchaeota* (EVANS *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2016; LAZAR *et al.*, 2016) e *Verstraetearchaeota* (VANWONTERGHEM *et al.*, 2016). O superfilo Asgard (ZAREMBA-NIEDZWIEZKA *et al.*, 2017; SPANG *et al.*, 2015; SEITZ *et al.*, 2016) compreende os filos *Lokiarchaeota* (SPANG *et al.*, 2015), *Thorarchaeota* (SEITZ *et al.*, 2016), *Heimdallarchaeota* e *Odinarchaeota* (ZAREMBA-NIEDZWIEZKA *et al.*, 2017). E o superfilo DPANN (CASTELLE *et al.*, 2015; RINKE *et al.*, 2013) que compreende o filo *Nanoarchaeota* (HUBER *et al.*, 2002) e outros grupos que ainda estão em discussão se formam ou não linhagens monofiléticas (PETITJEAN *et al.*, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2017).

**Figura 2.** Atual filogenia sugerida do Domínio *Archaea*.



Fonte: SPANG, CACERES e ETTEMA, 2017.

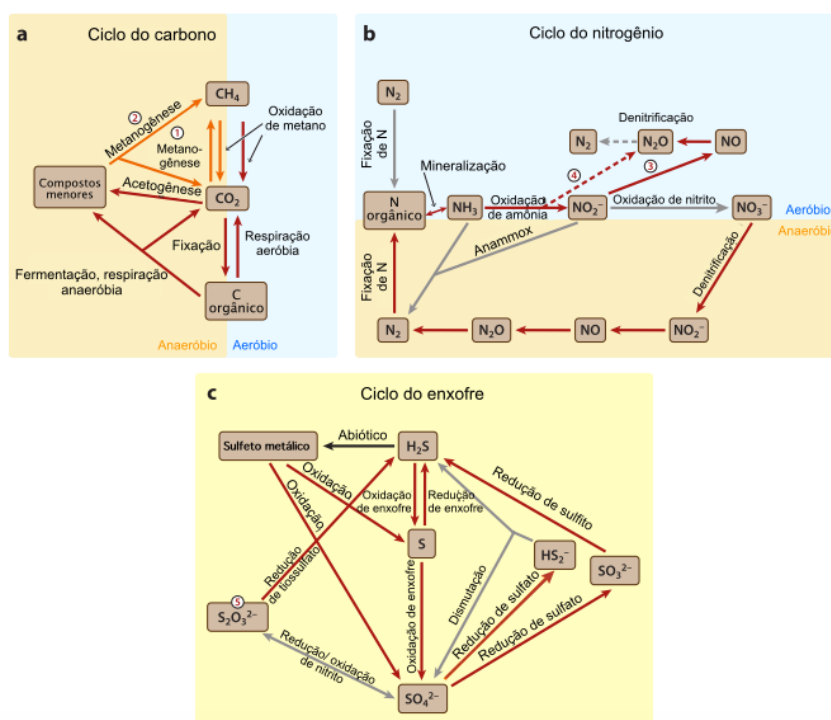
Até o presente momento, foram descritos 129 gêneros cultivados de arqueias (<http://www.bacterio.net>). Entretanto, a maior parte da diversidade de arqueias permanece não-cultivada (SCHLEPER, JURGENS e JONUSCHEIT, 2005) e é apenas conhecida através de sequenciamento do gene 16S rRNA (DELONG e

PACE, 2001). Acredita-se que mais da metade de representantes dos Domínios *Bacteria* e *Archaea* permanecem não-cultivados (DUTIHL e GARZA, 2015). Grande parte de arqueias cultivadas pertencem aos filos *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* (OFFRE, SPANG e SCHLEPER, 2013).

As arqueias representam aproximadamente 1-5% da totalidade de procariotos nos solos (BATES *et al.*, 2011; OCHSENREITER *et al.*, 2003), cerca de 20% nos oceanos (KARTAL *et al.*, 2012) e possivelmente representa o grupo dominante de micro-organismos em sedimentos marinhos (LIPP *et al.*, 2008).

As arqueias participam dos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio e enxofre (Figura 3). Alguns processos são realizadas exclusivamente por arqueias, como por exemplo a metanogênese.

**Figura 3.** Representação esquemática dos ciclos do (a) carbono, (b) nitrogênio e (c) enxofre. As setas em laranja representam processos realizados exclusivamente por arqueias; as setas em vermelho indicam processos realizados por arqueias e bactérias e as setas cinzas indicam processos realizados exclusivamente por bactérias.



Adaptado de Offre, Spang e Schleper, 2013.

Organismos metilotróficos exercem importante papel no ciclo do nitrogênio (CHISTOSERDOVA e LIDSTROM, 2013). A participação das arqueias no ciclo do nitrogênio envolve a oxidação de amônia a nitrito, na fixação de dinitrogênio ( $N_2$ ) e na desnitrificação. A oxidação de amônia é realizada por organismos pertencentes ao filo *Thaumarchaeota* (OFFRE, SPANG e SCHLEPER, 2013).

Além da produção de metano, as arqueias cumprem importante papel no ciclo do carbono no que diz respeito à oxidação anaeróbia de metano (AOM) que pode ser realizada tanto por arqueias metanotróficas (ANME), quanto por bactérias. A oxidação de metano funciona como um filtro natural, impedindo que a maior parte (cerca de 95%) de metano produzido seja emitido para a atmosfera (KUIVILA et al., 1988; LE MER E ROGER, 2001).

Foi descrito um grupo de arqueias que realizam a oxidação anaeróbia de metano, chamado de ANME. O grupo ANME pode ser dividido em: ANME-1, relacionadas às famílias *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*, ANME-2 que é relacionada à família *Methanosarcinales* e ANME-3 que é mais próxima do gênero *Methanococoides* (KNITTEL e BOETIUS, 2009). Sequências genéticas sugerem que a oxidação anaeróbia de metano ocorre através da via reversa da metanogênese, apresentando, inclusive, quase todas as enzimas envolvidas na metanogênese (MEYERDIERKS et al., 2010; HAROON et al., 2013). A oxidação anaeróbia de metano em ambientes aquáticos por bactérias foi atribuída a um novo filo, chamado NC10 (ETTWIG et al., 2010).

Alguns organismos pertencentes aos filos *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota* produzem sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) através da redução de enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) ou sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Boa parte das arqueias redutoras de sulfato são termofílicas e são encontradas em ambientes geotermiais (GITTEL et al., 2009). Algumas arqueias pertencentes as ordem *Sulfolobales* e *Thermoplasmatales* são capazes de oxidar minerais que contém enxofre, como pirita, calcopirita e marcassita (EHRlich e NEWMAN, 2009; GOLYSHINA e TIMMIS, 2005; RAWLINGS, 2002).

### 2.3.1 Arqueias metanogênicas

Acredita-se que a metanogênese foi um dos primeiros processos biológicos a surgir no planeta e teve importante papel na evolução da atmosfera terrestre (KERR, 2005), pois impediu que a Terra congelasse quando o Sol era entre 20 e 25% menos luminoso que hoje (WIECHERT, 2002). Apesar da metanogênese não produzir oxigênio livre diretamente, possivelmente foi importante para tornar a Terra habitável para organismos aeróbios (LIU, BEER e WHITMAN, 2012).

As arqueias metanogênicas cultivadas até o momento são pertencentes ao filo *Euryarchaeota* e estão distribuídas em sete ordens: *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* (BAPTESTE *et al.*, 2005), *Methanosarcinales* (ANDERSON *et al.*, 2009), *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* (SAKAI *et al.*, 2008) e *Methanomasiliicoccales* (PAUL *et al.*, 2012; IINO *et al.*, 2013). Outros grupos têm sido associados à produção de metano, como *Verstraetearchaeota*, capaz de produzir metano a partir de metanol, metilamina e metanotiol (VANWONTERGHEM *et al.*, 2016) e *Bathyarchaeota* (EVANS *et al.*, 2015).

Estima-se que as arqueias metanogênicas são responsáveis por mais de 90% da produção de metano (COSTA e LEIGH, 2014), o que corresponde a aproximadamente 1 bilhão de toneladas de metano por ano. O metano pode ser consumido por organismos metanotróficos e então sofrer reação com radicais hidroxila (LIU, BEER e WHITMAN, 2012).

Membros do filo *Euryarchaeota* são distribuídos globalmente, entretanto, algumas linhagens são mais abundantes em ambientes marinhos, solos e sedimentos (SCHLEPER, JURGENS e JONUSCHEIT, 2005; TESKE e SØRENSEN, 2008).

Dentre as arqueias isoladas de ambiente antártico encontram-se *Methanococcoides burtonii*, que é capaz de utilizar metanol e compostos metilados e apresenta temperatura ótima de crescimento a 23 °C e *Methanogenium frigidum* que utiliza CO<sub>2</sub> como fonte de carbono na presença de hidrogênio, e crescem a 15 °C, ambas isoladas do Ace Lake (FRANZMANN *et al.*, 1992, 1997).

#### 2.3.1.1 Metabolismo de arqueias metanogênicas

As arqueias metanogênicas são capazes de utilizar compostos de até dois carbonos como substrato, entretanto, podem depender de associações com outros grupos de micro-organismos, no processo de digestão anaeróbia, que irão quebrar moléculas maiores em compostos de no máximo dois carbonos.

Os processos de digestão anaeróbia podem ser divididos em algumas etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (BITTON, 2005), sendo que cada etapa tem participação de grupos de micro-organismos diferentes.



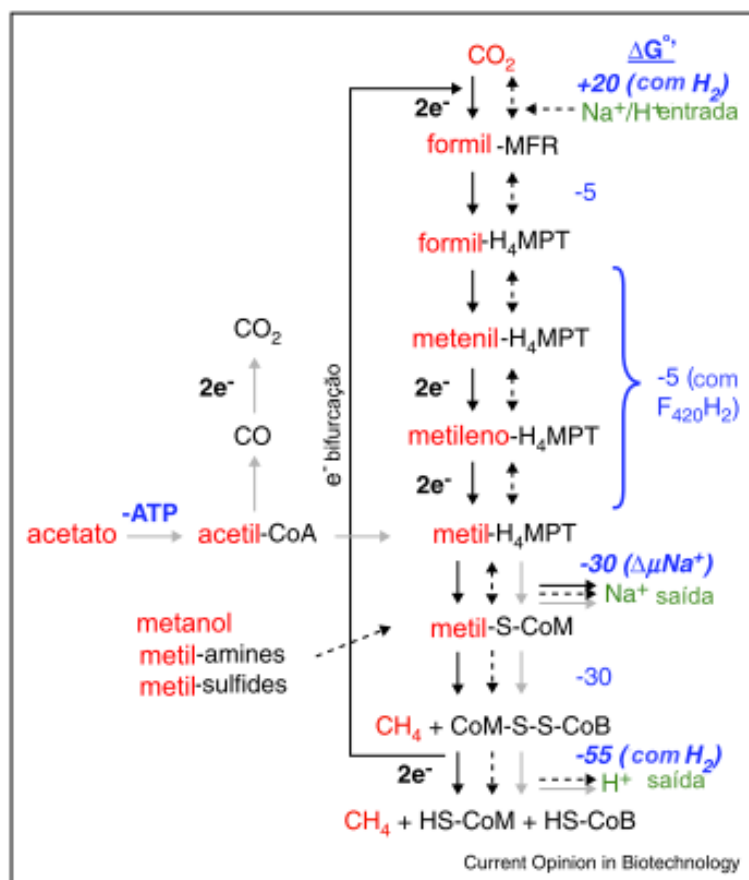
A hidrólise envolve a quebra de polissacarídeos, proteínas e lipídios através de enzimas extra celulares (amilase, celulase, lipase e protease) (SINGH e HARVEY, 2010), tendo a participação de bactérias pertencentes aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.

Na acidogênese os produtos formados na hidrólise são convertidos em ácidos graxos voláteis que incluem o acetato, propionato, isobutirato, butirato, valerato e isovalerato. Além de ácidos graxos voláteis, outros produtos formados são álcool, lactato, formiato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Alguns filos envolvidos na acidogênese são *Bacteroidetes*, *Chlorofexi*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* (STILES e HOLZAPFEL, 1997; GONG et al., 2000; BALK, WEIJMA e STAMS, 2002; YAMADA et al., 2006). As arqueias metanogênicas podem utilizar acetato, formiato, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> e compostos metilados como fonte de carbono, entretanto, outros compostos como propionato, isobutirato, butirato, isovalerato, valerato e etanol precisam ser degradados para servirem como fonte de carbono.

Na acetogênese estes intermediários formados na acidogênese são convertidos em acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> comumente por bactérias pertencentes aos gêneros *Pelotomaculum*, *Smithella* e *Syntrophobacter* (LIU et al., 1998; DE BOK et al., 2001; IMACHI et al., 2007).

A produção de metano pode ocorrer através de três vias distintas (Figura 4): hidrogenotrófica, acetotrófica e metilotrófica.

**Figura 4.** Vias de produção de metano. As setas pretas cheias referem-se à via hidrogenotrófica, as setas pretas tracejadas referem-se à via metilotrófica e as setas cinzas à via acetoclástica. Legenda: MFR: Metanofurano; H<sub>4</sub>MPT: tetraidrometanopterina; HS-CoM: Coenzima M; HS-CoB: Coenzima B.



Adaptado de Galagan et al., 2002.

Acredita-se que a via hidrogenotrófica seja evolutivamente mais antiga que a metilotrófica e acetotrófica (BLANK, 2009), uma vez que a concentração de hidrogênio quando a Terra era anóxica era da ordem de 1000 ppm (KASTING, 1993).

Na via hidrogenotrófica o hidrogênio funciona como um doador de elétrons para que ocorra a redução de CO<sub>2</sub>. A via inicia com o CO<sub>2</sub> sendo reduzido a um grupo formil ligado covalentemente ao metanofurano (MFR). Este grupo formil será então transferido ao tetraidrometanopterina (H<sub>4</sub>MPT) que sofrerá desidratação, gerando um metenil-H<sub>4</sub>MPT. O grupo metenil sofrerá redução a metileno-H<sub>4</sub>MPT e outra redução gerará o metil-H<sub>4</sub>MPT. O grupo metil, por sua vez, será transferido a um 2-mercaptoetanosulfonato Coenzima M (HS-CoM) e por fim, o grupo metil será reduzido a metano pela ação da metil-coenzima M redutase, um complexo enzimático presente em todas metanogênicas descritas até o momento (BORREL et al., 2013).

A via acetotrófica inicia-se pela quebra do acetato a acetil-Coenzima A (acetil-CoA), em seguida o grupo metil é incorporado a um H<sub>4</sub>MPT e o grupo carboxila é oxidado a fim de fornecer elétrons para a redução do grupo metil (COSTA e LEIGH, 2014).

A via metilotrófica inicia com o grupo metil entrando na via na forma de metil-Coenzima M (S-CoM). Os elétrons necessários para a redução do metil-S-CoM a metano provêm tanto do hidrogênio quanto da oxidação de outro grupo metil-S-CoM a CO<sub>2</sub>. A via metilotrófica é parcialmente reversa, metanol e compostos metilados são convertidos a metil coenzima-M e cerca de 75% da metil coenzima-M é reduzida para produzir metano, enquanto os outros 25% é oxidada a CO<sub>2</sub> (TIMMERS *et al.*, 2017).

Uma característica comum a todas as vias é a presença da metil coenzima M redutase (mcr) que atua na última etapa da metanogênese. O cofator F<sub>420</sub> também está presente nas arqueias metanogênicas e atua como carreador de elétrons, tendo baixo potencial redox (-340 mV) e quando exposto à luz UV confere um caráter fluorescente às células metanogênicas, permitindo sua fácil detecção em amostras a fresco (GORRIS, 1988; GREENING *et al.*, 2016).

A utilização de metanol e compostos metilados é restrita a grupos de arqueias que possuem citocromo (THAUER *et al.*, 2008). Entretanto, organismos pertencentes ao gênero *Methanospaera* conseguem converter metanol na presença de hidrogênio, mesmo não possuindo citocromo (JIANG, 2005), assim como organismos do gênero *Methanomicrococcus* e membros da ordem recém descoberta, *Methanomassiliicoccales* (LANG *et al.*, 2015) também conseguem converter esse composto apenas na presença de hidrogênio (Tabela 1). O uso destes compostos como fonte de carbono aparentemente é uma vantagem evolutiva, uma vez que bactérias redutoras de sulfato, que são conhecidas por competirem por substrato com arqueias metanogênicas, não são capazes de utilizá-los (OREMLAND e POLCIN, 1982).

Compostos metilados como a trimetilamina (TMA) são formados em ambientes marinhos como produtos da degradação de glicina-betaina ou da colina, compostos que servem como soluções osmóticas em diversos procariotos halofílicos e algas (KING, 1984; ZHUANG *et al.*, 2011). A TMA ainda pode ser metabolizada em compostos menores como a mono- e dimetilamina, além da oxidação da TMA que

pode ocorrer em águas superficiais, gerando óxido de TMA (TMAO) (KING, 1988). Além disso, a produção tanto de TMA quanto TMAO já foi observada em cerca de 20 espécies diferentes de macroalgas (FUJIWARA-ARASAKI e MINO, 1972).

Há pouco estudos sobre a concentração de TMA e outros compostos metilados no ambiente marinho, entretanto, Gibb e Hatton (2004) observaram que a concentração média de TMA em águas superficiais do Ryder Bay na Antártica foi de  $1,6 \cdot 10^{-6}$  mmoles.L<sup>-1</sup> ( $1,6 \cdot 10^{-6}$  mM), enquanto a de TMAO foi de  $15,2 \cdot 10^{-6}$  mmoles.L<sup>-1</sup> ( $15,2 \cdot 10^{-6}$  mM). Recentemente, Zhuang et al. (2018) quantificaram a concentração de compostos metilados, incluindo TMA, na água do Mar Mediterrâneo, entretanto, a TMA dissolvida não foi detectada e segundo os autores isto deve-se ao fato da TMA ter forte adsorção ao sedimento (WANG e LEE, 1990; FITZSIMONS et al., 2006; ZHUANG et al., 2017). Dessa forma, é possível que a concentração de TMA em sedimento marinho seja maior do que os valores observados em águas superficiais.

O metanol é originado como produto final da degradação da pectina (SCHINK e ZEIKUS, 1982) e pode ser produzido pelo fitoplâncton (MINCER e AICHER, 2013). A alta solubilidade do metanol na água é um dos motivos dos poucos dados sobre a concentração de metanol em sedimentos anóxicos (YANAGAWA et al., 2016). Zhuang et al. (2014) quantificaram a concentração de metanol e etanol em sedimento marinho e água intersticial coletado no Golfo do México e no Mar Negro através de três técnicas diferentes de pré-tratamento de amostra: injeção aquosa direta (DAI), microextração por fase sólida (SPME) e *Purge & Trap* (P&T), todas associadas a cromatografia gasosa (GC) com detector de ionização de chama (FID) ou espectrômetro de massa (MS). No sedimento coletado no Mar Negro a concentração de metanol atingiu 6 µM a 51 e 507 cm abaixo do fundo do mar e variou entre 14-15 µM a 51 cm e 6-7 µM a 547 cm abaixo do fundo do mar, enquanto no sedimento coletado no Golfo do México a concentração de metanol variou de 11-78 µM. O autor observou que a concentração de metanol no sedimento do Mar Negro atingiu seu máximo na transição para a zona de metanogênese.

Apesar das vantagens ecológicas, a utilização de compostos metilados resulta na formação de formaldeído, um intermediário tóxico de algumas vias oxidativas de C1 (CHRISTOSERDOVA, 2015). Uma das vias de oxidação do formaldeído envolve o uso de tetrahidrometanopterin (H<sub>4</sub>MPT) e metanofurano como cofatores (CHRISTOSERDOVA et al., 1998).

**Tabela 1.** Gêneros de arqueias metanogênicas metilotróficas e principais características.

Gênero	Descrição morfológica	Substratos utilizados	Habitats/origem do isolado	Condições de cultivo	Descrição da colônia	Referência
<i>Methanococcoides</i>	Cocos irregulares 0,8-1,8 µm; móveis ou não	Metanol, mono-, di- e trimetilamina	Antártica e cânion submarino	Cresce entre 1,7-35°C, pH ~7,5, extrato de levedura e vitamina estimulam crescimento	Circular, convexa e amarela com diâmetro de 0,5-1,5 mm	SOWERS, 2015
<i>Methanosarcina</i>	Células esféricas irregulares de 1-3 µm de diâmetro, podem formar agregados; imóveis	Acetato, metanol, mono-, di- e trimetilamina, H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> e CO	Água doce, sedimento marinho, sedimento de água doce e rúmen	Cresce entre 30-50°C (varia de acordo com a espécie), pH ~7,0, extrato de levedura e vitamina estimulam crescimento	Circular, transparente, branca ou amarelo clara	BOONE e MAH, 2015
<i>Methanlobus</i>	Cocos irregulares 1-1,5 µm, imóveis	Metanol e metilaminas	Sedimento marinho, e sedimento estuarino	Cresce entre 30-45°C, pH ~8, extrato de levedura e vitamina estimulam crescimento	Circular, translúcida, ocre, branco-esverdeada ou incolor.	BOONE, 2015
<i>Methanohalophilus</i>	Cocos irregulares 0,5-2 µm que podem formar agregados; imóveis	Metanol e metilaminas	Ambientes salinos	Cresce entre 10-45°C, pH~7,5 e biotina estimula crescimento	Circular, creme a amarelo clara	BOONE, 2015
<i>Methanosphaera</i>	Células esféricas de ~1 µm de diâmetro que podem ocorrer em pares, tétrades ou agregados; imóveis	Metanol (na presença de H <sub>2</sub> )	Conteúdo retal de coelhos e fezes humanas	Cresce entre 30-40°C, pH ~6,5-6,9, biotina estimula crescimento	Opaca a translúcida, circular ou elíptica	MILLER, 2015
<i>Methanomicrococcus</i>	Cocos irregulares que podem ocorrer sozinhos ou em aglomerados	Metanol e metilaminas (na presença de H <sub>2</sub> )	Intestino de barata	Cresce a 39°C pH 7,2-7,5, acetato, extrato de levedura e vitaminas são necessários para crescimento	Bicôncava, amarela/marrom com diâmetro de 0,3 mm	SPRENGER et al., 2000
<i>Methanomassiliicoccus</i>	Células esféricas de ~850 nm de diâmetro, podem ocorrer sozinhas, imóveis	Metanol, mono-, di- e trimetilamina (na presença de H <sub>2</sub> )	Intestino de humanos, ruminantes e plantaço de arroz	Cresce entre 25-45°C, pH 7,6, extrato de levedura e vitaminas do complexo B estimulam crescimento	-	N K A M G A e DRANCOURT, 2016

## 2.4 Métodos de estudo de ecologia microbiana aplicado às arqueias

### 2.4.1 Métodos dependentes de cultivo

O cultivo de arqueias metanogênicas estritamente anaeróbias exige que todos os tipos de manipulação evitem ao máximo a presença de oxigênio. Desse modo, os métodos de cultivo de arqueias metanogênicas diferem daqueles utilizados na microbiologia convencional. Para garantir a anaerobiose devem ser adotadas técnicas de manipulação de culturas e preparo de material sob atmosfera controlada, que pode ser obtida através de sistemas de distribuição de gases. Os meios de cultura também são acrescidos de substâncias redutoras para manter o potencial de oxido-redução abaixo de -300 mV (ZINDER, 1993; ROTHE e THOMM, 2000).

A técnica de roll-tube (HUNGATE e MACY, 1973) consiste na distribuição de um meio contendo ágar nas paredes internas de um tubo de modo que haja a formação de uma fina camada. Nesta técnica também é utilizada atmosfera controlada a fim de evitar a entrada de oxigênio.

Singh et al. (2005) realizaram cultivo a partir de amostras de sedimento marinho coletadas na Baía Skan (Alasca). O sedimento foi inoculado em meio MSH contendo 20 mM de TMA e em seguida foi diluído em série. Todos os tubos foram inoculados a 15 °C e monitorados quanto a produção de metano e foi observado que a maior diluição que produziu metano foi a  $10^{-3}$  após 4 semanas de incubação. As culturas foram então isoladas através de roll-tube e confirmada a pureza através de microscopia, sendo obtidas três culturas puras. Através de sequenciamento do gene 16S rRNA foi possível observar que os organismos de uma das culturas era mais próximo a *Methanosarcina baltica*, entretanto, estudos de hibridização DNA-DNA indicam que a relação é de 88%, sugerindo uma nova linhagem dentro dessa espécie, enquanto as outras duas culturas eram 99,8% similares a *Methanococcoides burtonii*, mas a análise de hibridização DNA-DNA indica que uma das culturas tem uma proximidade de 55%, sugerindo uma nova espécie que foi denominada *M. alaskense*.

O estudo de micro-organismos estritamente anaeróbios utilizando-se apenas de técnicas dependentes de cultivo é difícil pois estes organismos apresentam baixo

metabolismo e condições muito específicas de cultivo (SEKIGUCHI, 2006; SAKAI *et al.*, 2009). Por conta dessa dificuldade, há um grande número de arqueias ainda não cultivadas e não isoladas.

A dificuldade em simular condições encontrados nos ambientes de origem dos micro-organismos, tais como interações sintróficas, simbiose e parâmetro nutricionais, são algumas das condições responsáveis pela baixa taxa de micro-organismos cultivados (NICHOLS *et al.*, 2008). Em boa parte dos ambientes são encontradas condições oligotróficas e ao serem transferidos desses ambientes para condições laboratoriais com meio enriquecidos, os micro-organismos podem ter o crescimento inibido, especialmente aqueles com baixas taxas metabólicas, ou até mesmo morrerem (PRAKASH *et al.*, 2013).

Imachi *et al.* (2011) cultivaram arqueias metanogênicas a partir de amostras de sedimento marinho. O cultivo foi realizado em um biorreator de fluxo contínuo que recebia água do mar sintética e aos 560 e 761 dias de incubação foram retiradas amostras para realizar cultivo em *vials* contendo 20 mL de meio sob atmosfera de  $N_2:CO_2$  e diferentes substratos metanogênicos (TMA, metanol, 2-propanol, formiato ou  $H_2$ ), além de glicose, extrato de levedura, acetato ou propionato e seus respectivos produtos de fermentação (etanol, lactato e butirato). Também foram feitos cultivos na presença e ausência de antibióticos, a fim de obter culturas de arqueias. Nas culturas contendo TMA ou metanol foram identificadas arqueias pertencentes aos gêneros *Methanococcoides* e *Methanosarcina*, respectivamente.

Através de cultivo de enriquecimento a partir de sedimento estuarino, Ticak *et al.* 2015, observaram que o gênero *Methanococcoides*, que é exclusivamente metilotrófico, também é capaz de usar compostos metilados quaternários, como o tetrametilamônio (QMA). Um dos isolados obtidos crescia na presença de QMA e TMA, mas na presença de dimetilamina, monometilamina e metanol o crescimento era mais lento. Esse mesmo isolado ao crescer com 80 mM de QMA atingia a fase de "morte" logo após a fase estacionária, possivelmente pelo acúmulo de amônia ou mudança de pH do meio.

#### 2.4.2 Métodos independentes de cultivo

Métodos independentes de cultivo são aqueles que possibilitam caracterizar uma comunidade microbiana sem que os organismos em questão sejam enriquecidos. Alguns exemplos de técnicas incluem o qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*), o DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), o FISH (*fluorescent in situ hybridization*) e o sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq.

A técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) envolve a amplificação de genes ou sequências de genes específicas. O PCR quantitativo (qPCR), variação do método tradicional, permite quantificar o número de cópias de genes taxonômicos ou funcionais, o que permite inferir sobre variações na abundância de genes e/ou diferentes níveis de expressão de um determinado gene em uma amostra ambiental ou de cultivo.

O gene que codifica para a unidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) é amplamente utilizado como um marcador filogenético e a aplicação de técnicas de sequenciamento genômico e metagenômico permitem a detecção e identificação de arqueias. Além disso, genes funcionais, como o gene que codifica a subunidade alfa da metilcoenzima redutase (*mcrA*), restrito às arqueias metanogênicas, pode ser utilizado para identificar arqueias metanogênicas e monitorar processos metanogênicos (HALLAM *et al.*, 2003).

O desenvolvimento das técnicas moleculares nos últimos 50 anos permitiu que a biodiversidade de micro-organismos, incluindo arqueias, fosse um pouco mais conhecida, possibilitando compreender a composição, estrutura e funcionalidade de comunidades microbianas (GARZA e DUTILH, 2015). O avanço de técnicas moleculares permitiu o sequenciamento do genoma de arqueias não cultivadas a partir de culturas de enriquecimento (ELKINS *et al.*, 2008; HALLAM *et al.*, 2006) e até mesmo de *single cells* (BLAINEY *et al.*, 2011). Para exemplificar, em um estudo recente, três sequências parciais do genoma de arqueias provenientes de sedimento marinhos foram reconstruídas o que gerou um possível novo filo, o *Lokiarchaeota* (SPANG *et al.*, 2015).

Apesar do conhecimento da biodiversidade de micro-organismos ter sido ampliada com o advento das técnicas moleculares, ainda permanecem lacunas



entre a avaliação do potencial genômico e a atribuição da função de genes e proteínas (ZENGLER et al., 2002; GIOVANNONI e STINGL, 2007; CARDENAS e TIEDJE, 2008).

Utilizar apenas métodos dependentes ou independentes de cultivo isolados não é suficiente para estudar adequadamente a diversidade microbiana. Dados moleculares podem ser usados como base para aperfeiçoar protocolos de cultivo, assim como novos isolados permitem o descobrimento de novas vias metabólicas, além de permitir que *primers* e sondas mais eficientes sejam desenhadas (GIOVANNONI e STINGL, 2007; SONG et al., 2009; STEWART, 2012; ZENGLER e PALSSON, 2012).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi estudar a diversidade cultivável de arqueias metanogênicas metilotróficas a partir de sedimento marinho coletado nas proximidades da geleira Wanda, Arquipélago Ilhas Shetlands do Sul, Antártica. Para atingir este objetivo, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- cultivar arqueias metanogênicas em meio salino contendo os substratos metanol e/ou trimetilamina em diferentes concentrações finais na presença ou não de hidrogênio;
- determinar taxas de produção de metano em função das diferentes concentrações de substratos metanogênicos distintos;
- caracterizar morfológicamente as células encontradas nos cultivos através de microscopia de contraste de fase e fluorescência;
- conhecer a composição taxonômica das culturas enriquecidas através de sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq;
- obter colônias através de técnicas de isolamento e caracterizar através de métodos de microscopia e sequenciamento do gene rRNA 16S.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de amostra

Uma amostra de sedimento foi coletada nas proximidades da geleira Wanda (62°06'08,4"S, 58°21'15,6"W) pela equipe associada ao Projeto "A vida microbiana na criosfera Antártica: mudanças climáticas e bioprospecção (MICROSFERA)", CNPq 407816/2013-5, coordenado pela Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari, do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, utilizando draga *Petit Ponar* durante a Operação Antártica XXXIII no período de dezembro a fevereiro de 2015 e armazenadas em saquinhos estéreis tipo *whirl pack* a 4 °C até o momento do uso.

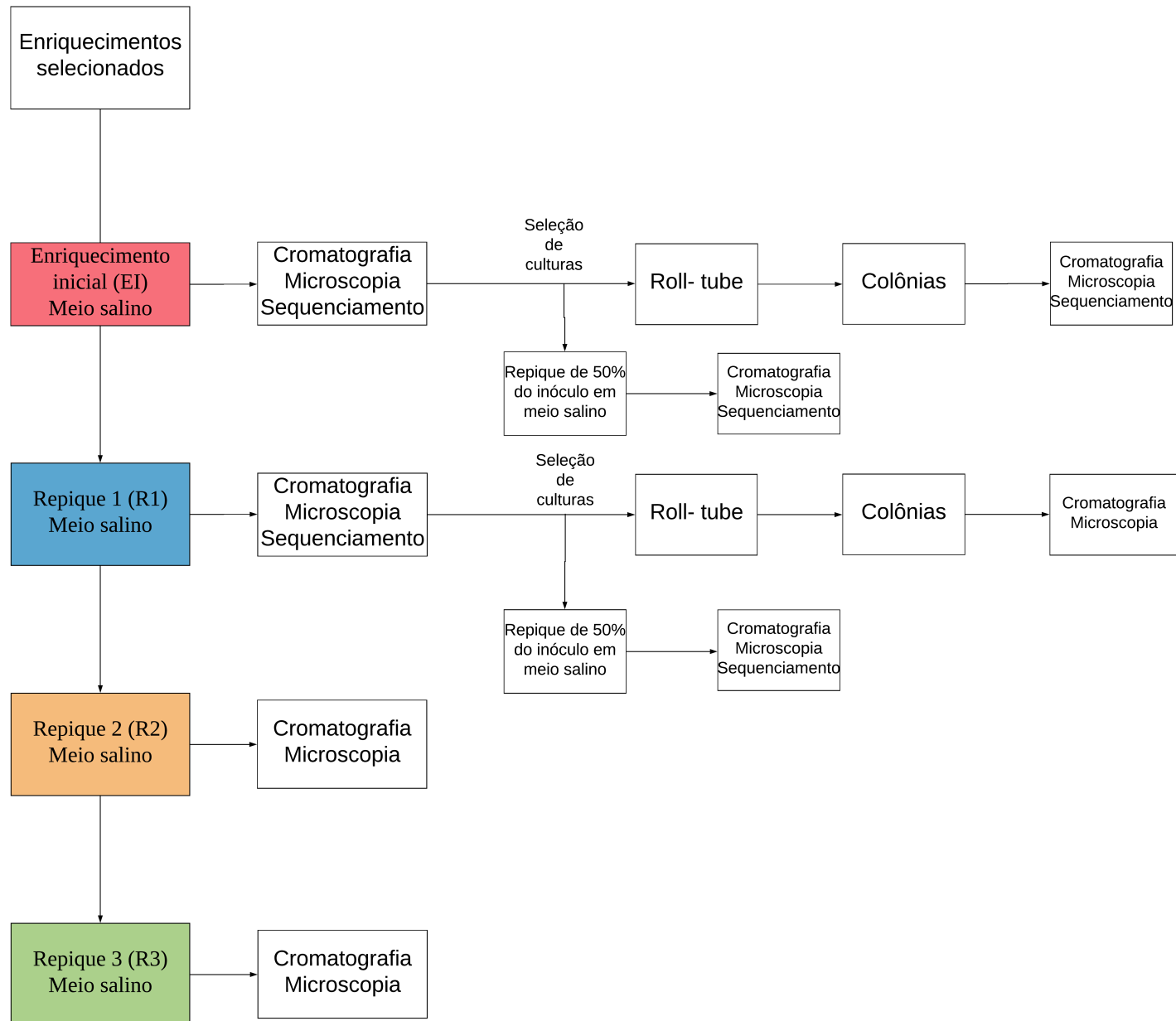
O sedimento foi coletado a 25 m de profundidade, apresentava partículas predominantemente do tamanho de areia e poucas partículas do tamanho de silte e argila, havia a presença de rochas e pedaços de algas.

### 4.2 Desenho experimental

A partir do sedimento coletado foi realizada uma etapa inicial de enriquecimento de culturas metanogênicas metilotróficas durante trabalho de conclusão de curso (RAFAEL, 2015). A construção da estratégia experimental adotada inicialmente partiu de informações existentes na literatura sobre a área de estudo, as quais apontavam para uma presença significativa de arqueias pertencentes ao filo *Euryarchaeota* e à classe *Thermoplasmata* (PESSI et al., 2015), à qual pertence também a ordem *Metanomassiliicoccales*. Esta ordem, descoberta recentemente, é conhecida por utilizar metanol na presença de hidrogênio e metilaminas como substratos metanogênicos (BORREL et al., 2012; PAUL et al., 2012; DRIDI et al., 2012; IINO et al., 2013, POULSEN et al., 2013; BRUGERE et al., 2013; LANG et al., 2015). Apesar de não haver indícios mais conclusivos da presença da ordem metanogênica, optou-se por utilizar substratos metilotróficos como o metanol e a trimetilamina, na presença ou não de hidrogênio para obtenção de culturas metanogênicas a partir de sedimento das proximidades do glacier Wanda.

Foram testadas duas condições diferentes de meio (salino e não salino) e duas diferentes concentrações de substratos (5 mM ou 10 mM de trimetilamina e

metanol), totalizando quatro culturas, todos sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ . A partir destes testes iniciais foram escolhidas as duas culturas em meio salino para o desenvolvimento deste trabalho pois estavam produzindo metano. Estes cultivos de enriquecimento inicial (EI) foram então submetidos às etapas descritas no desenho experimental esquematizado na Figura 5.

**Figura 5.** Desenho experimental.

Os enriquecimentos selecionados foram repicados (R1) em diferentes concentrações de substratos e na presença de diferentes gases (ver item 4.3). O monitoramento das culturas também foi feito através de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID), usando as condições descritas em Nakayama et al. (2011), microscopia de contraste de fase e fluorescência, extração e sequenciamento de DNA. Foram realizadas realimentações, trocas de atmosfera e reposição de meio caso observada estabilização da produção de metano.

As culturas foram repicadas mais duas vezes (R2 e R3) seguindo as mesmas condições das culturas anteriores. No caso do R3, foram apenas repicadas as culturas do R2 que produziram metano.

Para a realização de roll-tube e sequenciamento buscou-se escolher apenas culturas que produziam metano, visando o isolamento e caracterização de arqueias metanogênicas.

Com base na produção de metano foram selecionadas três culturas (2, 7 e 8) que foram repicadas em meio salino seguindo as mesmas condições de cultivo, mas utilizando 50% da cultura como inóculo.

### **4.3 Cultivo de enriquecimento**

Para realizar os cultivos de enriquecimento, primeiramente foi preparado o meio água do mar sintética modificada (Tabela 2), sob condições de anaerobiose. Em seguida, o meio foi distribuído em tubos Hungate e autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Antes de realizar o inóculo, a atmosfera dos tubos foi trocada para N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (70:30) e foram acrescentados 0,1 mL de uma solução de bicarbonato de sódio (10%), 0,1 mL de solução de vitaminas (Anexo A), substratos metanogênicos com concentração final de 10 ou 20 mM e por fim 0,2 mL de solução redutora (L-cisteína 0,1%). Foi utilizado 0,5 g de sedimento para cada tubo.

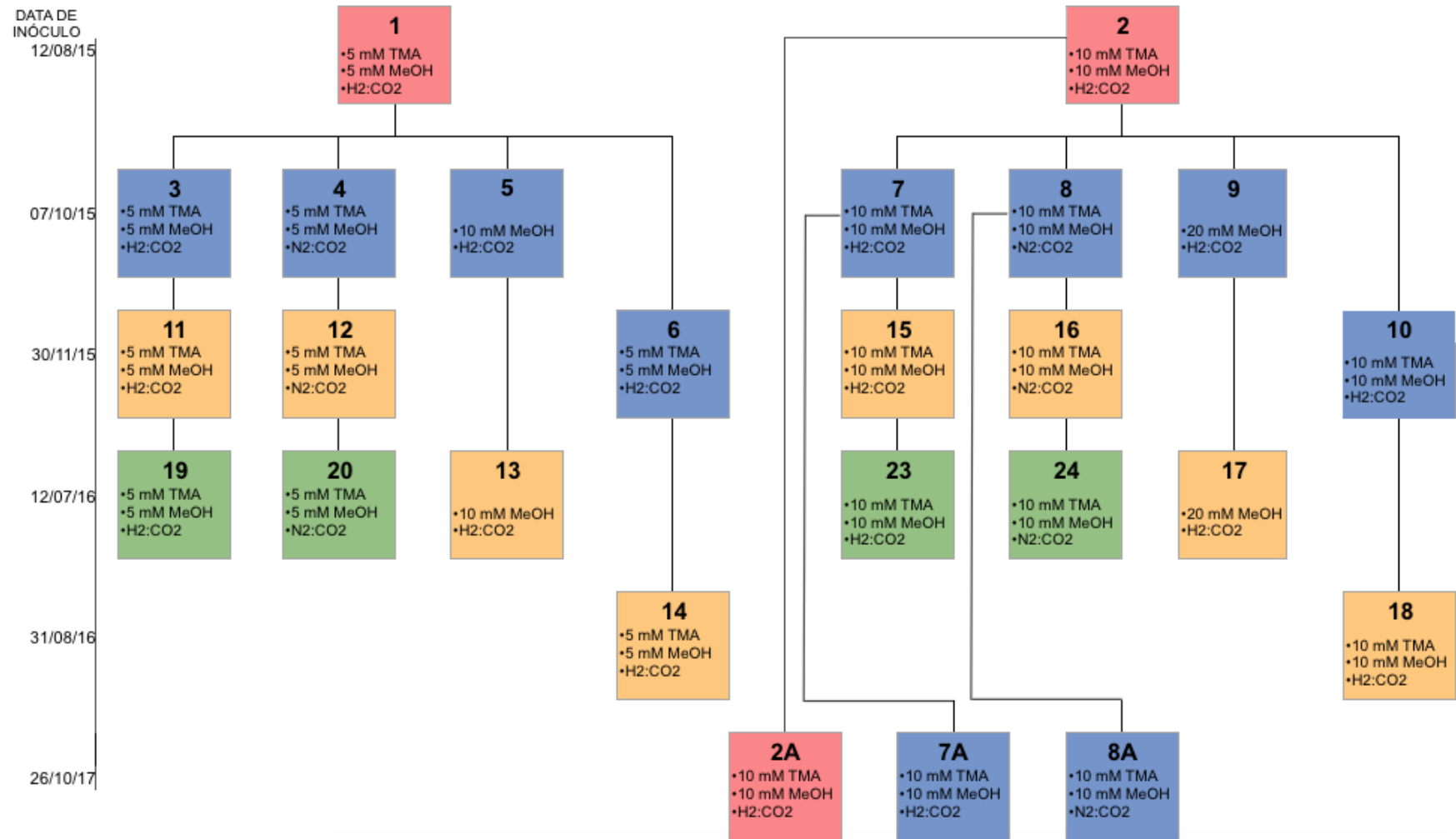
**Tabela 2.** Composição da água do mar sintética modificada (KELLER, 1987).

Reagentes	Quantidade
NaCl	24,55 g
KCl	0,75 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,07 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,47 g
MgSO <sub>4</sub>	6,04 g
Extrato de levedura	0,50 g
Solução traço de metais	10 mL
Água Milli-Q	1000 mL

Os tubos foram incubados a 20 °C em posição horizontal a fim de aumentar a superfície de contato do meio com a atmosfera. Após quinze dias de incubação foram feitas medidas de produção de metano e, após a detecção de metano na atmosfera dos tubos foram feitos repiques e análises microscópicas das culturas em microscópio de contraste de fase e fluorescência.

A partir desse enriquecimento inicial, foram feitos três repiques (Figura 6) seguindo as mesmas condições utilizadas anteriormente, em frascos de antibiótico de 30 mL tampados com batoques de borracha de butila e fechados com lacres de alumínio.

**Figura 6.** Sequência de repiques realizados a partir das culturas de enriquecimento. Em vermelho são as culturas iniciais; em azul o primeiro repique (R1); em laranja o segundo repique (R2) e em verde o terceiro repique (R3).





As culturas foram monitoradas quanto à produção de metano através de cromatografia gasosa. Para análise foram retiradas alíquotas de 0,1 mL de gás presente na atmosfera do frasco com auxílio de seringa descartável de 1mL e injetadas em cromatógrafo a gás HP8560 equipado com detector de ionização de chamas (FID), seguindo as condições descritas por Nakayama et al. (2011).

Periodicamente foram retiradas amostras de cada cultura a fim de observar as morfologias presentes, número de células e presença ou não de auto-fluorescência. A observação foi feita com um microscópio Olympus BX51 com sistema de captura de imagem CCD Olympus DP72 e processadas pelo programa ImagePro 6.3 (Media Cybernetics).

Amostras para sequenciamento de DNA foram retiradas de acordo com alterações na produção de metano, tanto picos de produção quanto quedas, e armazenadas a -80 °C.

#### **4.4 Isolamento por roll-tube**

A fim de obter colônias isoladas de arqueias metanogênicas, foram escolhidas culturas que estavam produzindo metano (1, 2 e 9). Primeiramente as culturas foram diluídas a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  e em seguida inoculadas em frascos para roll-tube, contendo o mesmo meio das culturas originais acrescido de 2% de ágar bacteriológico. Após adicionar o ágar os frascos foram autoclavados. Para realizar o inóculo, foram seguidas as mesmas etapas de preparo do meio de cultura descritas para o meio líquido (item 4.3). Em seguida foi acrescido 1,0 mL de inóculo em cada frasco e estes frascos foram rolados rapidamente em uma bandeja contendo água e gelo até a solidificação do meio. Os frascos foram incubados a 20 °C em posição invertida a fim de manter a água de condensação próxima à tampa do frasco. Além de observar a formação de colônias, também foi medida a produção de metano através de cromatografia gasosa.

As colônias foram removidas do frasco com o auxílio de pipeta de vidro com a ponta curva, sob fluxo de nitrogênio e transferidas para meio líquido, seguindo as mesmas condições dos cultivos iniciais. Ao retirar algumas colônias e inocular em meio líquido, foi observado por microscopia que as colônias não estavam isoladas.

Dessa forma, para a retirada das colônias dos outros roll-tubes buscou-se escolher colônias isoladas com auxílio de uma lupa binocular Zeiss Stemi SV11.

## **4.5 Extração de DNA**

### **4.5.1 Extração de DNA de amostras de cultura e de amostra de sedimento**

Foram retiradas amostras para extração de DNA de acordo com alterações nos padrões de produção de metano ou no tempo zero de cada inóculo e armazenados a -80°C até o momento de uso. Para realizar a extração de DNA das amostras de cultura foi utilizado o Kit PureLink® (Invitrogen, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Para extração de DNA da amostra de sedimento foi utilizado o PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, CA, EUA) e seguidas as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento de uso.

## **4.6 Análise de sequências**

Na primeira análise de sequências as amostras de DNA previamente extraídas das culturas 1, 2, 7 e 8 foram enviadas para sequenciamento na plataforma Illumina Miseq na empresa Macrogen (Coreia). Numa segunda análise, amostras das culturas 5, 7, 8, 9, 2A, 7A, 8A e cinco colônias obtidas da diluição  $10^{-4}$  do roll-tube da cultura 1 para sequenciamento na plataforma Illumina Miseq foram enviadas para a empresa Mr. DNA (Texas, EUA) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resumo das amostras enviadas para sequenciamento relacionando o tempo de incubação e produção de metano.

Cultura	Tempo de incubação	Metano	Empresa
1 (EI - 5 mM H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	257	Estabilizado	Macrogen
2 (EI - 10 mM H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	257	Estabilizado	Macrogen
7 (R1 - 10 mM H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	201	Produção de metano	Macrogen
8 (R1 - 10 mM N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	201	Produção de metano	Macrogen
7 (R1 - 10 mM H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	Tempo zero	-	Mr. DNA
8 (R1 - 10 mM N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	Tempo zero	-	Mr. DNA
5 (R1 - 10 mM MeOH H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	671	Produção de metano	Mr. DNA
9 (R1 - 20 mM MeOH H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	645	Produção de metano	Mr. DNA
2A (10 mM H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	14	Produção de metano	Mr. DNA
7A (10 mM H <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	22	Produção de metano	Mr. DNA
8A (10 mM N <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> )	14	Produção de metano	Mr. DNA
Colônia 1 1.10 <sup>-4</sup>	87	-	Mr. DNA
Colônia 2 1.10 <sup>-4</sup>	87	-	Mr. DNA
Colônia 3 1.10 <sup>-4</sup>	87	-	Mr. DNA
Colônia 4 1.10 <sup>-4</sup>	87	-	Mr. DNA
Colônia 5 1.10 <sup>-4</sup>	87	-	Mr. DNA
Sedimento	-	-	Mr. DNA

Para a amplificação da região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA foram utilizados os *primers* universais 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (CAPORASO *et al.*, 2010) com cobertura de 86,8% para o Domínio *Bacteria* e 52,9% para o Domínio *Archaea*. A cobertura dos *primers* foi verificada através da ferramenta ARB PT - SILVA (<https://www.arb-silva.de/search/testprime/>) (LUDWIG *et al.*, 2004).

A análise das sequências foi realizada no software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) (CAPORASO *et al.*, 2010), seguindo quatro etapas: (1) os *reads* pareados (R1 e R2) foram unidos através do software PEAR (ZHANG *et al.*, 2011), definindo o tamanho mínimo de sobreposição entre os *reads* e o comprimento mínimo das sequências (250 pares de base); (2) utilizando o software USEARCH 8, (EDGAR, 2010) as sequências foram trimadas e foi determinado o tamanho mínimo

de 250 pares de bases e máximo de 350 pares de bases; (3) as sequências foram agrupadas em OTUs com similaridade de 97%, classificadas pela base de dados SILVA v132 (<https://www.arb-silva.de>) e foram filtradas para selecionar apenas as sequências que representassem mais de 0,1% de abundância relativa; (4) os gráficos de barra com as classificações foram feitos através do software R (R Development Core Team, 2008).

Para as amostras enviadas à empresa Mr. DNA, não houve necessidade de executar a etapa de junção das sequências R1 e R2, uma vez que a empresa já forneceu as sequências unidas. As demais etapas foram executadas como descrito acima.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Sequenciamento de amostra de sedimento

Foram encontradas 80.170 sequências que foram classificadas em 425 unidades operacionais taxonômicas (OTUs) distribuídas em uma amostra de sedimento. Os filos mais abundantes encontrados no sedimento coletado próximo à geleira Wanda foram: *Proteobacteria* (66,5%) e *Bacteroidetes* (16,2%). Os filos *Verrucomicrobia* (5,2%), *Actinobacteria* (4,0%), *Planctomycetes* (2,5%) e *Acidobacteria* (1,0%) também foram observados, mas em menor abundância (Figura 7).

Segundo Pessi et al. (2015) os filos mais abundantes nas amostras de solo coletadas nas proximidades da geleira Wanda foram *Proteobacteria* (47,8%), seguido de *Bacteroidetes* (18,5%), *Euryarchaeota* (10,0%), *Actinobacteria* (4,9%), *Planctomycetes* (3,1%), *Crenarchaeota* (2,8%), *Acidobacteria* (2,0%) e *Verrucomicrobia* (1,5%). Dos 8 filos encontrados no trabalho de Pessi et al. (2015), 6 também foram encontrados no presente trabalho e em proporções semelhantes. Os outros 2 filos que não foram observados são ambos do Domínio *Archaea*, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*. Entretanto, os enriquecimentos iniciais 1 e 2, inoculados diretamente com sedimento, apresentaram atividade metanogênica intensa com poucos dias de incubação, indicando que o inóculo continha uma população ativa de arqueias metanogênicas (RAFAEL, 2015).

Uma possível explicação para os resultados contrastantes derivados do sequenciamento e do cultivo pode estar relacionada ao método de extração de DNA. Diversos fatores podem influenciar na eficiência de extração de DNA, incluindo o tipo de amostra (sedimento, no caso deste trabalho), o método de extração de DNA e a própria composição da parede celular de arqueias.

Theiss, Rother e Röske (2016) avaliaram a influência de diferentes kits de extração de DNA de arqueias na qualidade e quantidade de DNA extraído de amostras de lodo de uma planta de biogás. Os kits utilizados pelos autores para extração de DNA foram Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit - MO BIO Laboratories (UC), Power Soil DNA Isolation Kit - MO BIO Laboratories (PS), NucleoSpin Soil Kit — Macherey-Nagel (MN), JET Genomic DNA Purification Kit (JET) e QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit—QIAGEN (QIA). Após a extração de DNA, a análise de diversidade foi feita através de DGGE e a técnica de qPCR foi utilizada para comparar a quantidade de cópias de genes de bactérias obtidas após cada tipo de extração. O DNA extraído e isolado através dos diferentes métodos foi visualizado através de gel de eletroforese e quantificado via espectrofotometria a 260 e 280 nm. Uma razão abaixo de 1,8 da proporção 260/280 indicava que a qualidade do DNA era baixa, o que foi o caso dos kits PS, UC e JET. Na análise de DGGE, foram utilizados entre 80-100 ng de produto de PCR utilizando 2 pares de primers de Archaea. Para a interpretação dos resultados dos padrões de bandas, foram construídos dendogramas com base no coeficiente de similaridade de Jaccard e no método UPGCMA (método de grupos de pares não ponderados com média aritmética) de clusterização. Os autores concluíram que o kit MN foi o mais adequado para reproduzir a comunidade de arqueias nas amostras de diferentes reatores de biogás. Em relação ao qPCR, o número de cópias de genes de bactérias só apresentou diferenças quando foram utilizados os kits UC e JET. Já o número de cópias de genes de arqueias sofreu maior variação com os kits QIA, PS, UC e JET. Os autores concluíram que para lodo de planta de biogás o kit MN foi o que melhor representou a diversidade de arqueias.

Roopnarain et al. (2017) também avaliaram a influência de diferentes métodos de extração na qualidade e quantidade de DNA extraído de bactérias e arqueias a partir de amostras de digestor anaeróbio. Foram utilizados os kits Soil Microbe DNA MiniPrep—Zymo Research (ZR), QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit—QIAGEN (QIA),

NucleoSpin Soil Kit— Macherey-Nagel (MN), MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit—Manual— Thermo Fisher Scientific (Mag-Man), MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit—Automated— Thermo Fisher Scientific (Mag-Aut), Powersoil DNA Isolation Kit— MO BIO laboratories (PS), Meta-G-Nome DNA Isolation Kit— Epicentre (EPI) e extração com brometo de cetrimônio (CTAB). A maior quantidade de DNA quantificada com Qubit foi observada nas amostras extraídas com CTAB, seguido por ZR, MN, QIA, OS Mag-Aut, Mag-Man e EPI. Em relação ao coeficiente da proporção 260/280, os kits que tiveram valor igual ou maior que 1,8, ou seja, que apresentavam DNA mais puro foram Mag-Aut, QIA e MN.

As arqueias possuem paredes celulares de diversos tipos incluindo camadas de proteínas de membrana (S-layer), pseudomureína, metanocondroitina e combinações desses polímeros e S-layer (ALBERS e MEYER, 2011). As estruturas da parede celular permitem maior resistência à lise (JARRELL et al., 1992), incluindo a presença das proteínas de membrana (S-layer) em células de algumas arqueias, que evita a lise por alguns métodos de extração de DNA. Segundo dados obtidos no trabalho de Roopnarain et al. (2017), os kits ZR, MN, PS e Mag-Aut foram eficientes em lisar as células que apresentavam S-layer.

Apesar dos dois trabalhos citados não serem de amostras de sedimento, é possível observar que o método de extração tem grande influência na quantidade e qualidade de DNA obtida, especialmente de células de arqueias. Ambos os trabalhos sugerem que o kit NucleoSpin Soil Kit— Macherey-Nagel (MN) seja a melhor opção para extração de DNA de arqueias metanogênicas, entretanto, no trabalho de Pessi et al. (2015) foi utilizado o mesmo kit que neste trabalho (Powersoil DNA Isolation Kit). Dessa forma, a ausência do filo *Euryarchaeota* no sequenciamento da amostra de sedimento pode estar relacionada ao protocolo de extração de DNA utilizado, mas também não se pode descartar a possibilidade da cobertura dos *primers* utilizados ter sido insuficiente, apesar de dados sugerirem que os *primers* utilizados no presente trabalho são mais abrangentes que os utilizados por Pessi et al. (2015), inclusive para grupos metanogênicos (Tabela 4). Novas extrações com adaptações no método deverão ser incluídas para análises posteriores, incluindo testes com *primers* específicos para o Domínio *Archaea* para confirmação dos resultados.

**Tabela 4.** Cobertura dos *primers* utilizados no presente trabalho (515f/806r) e no trabalho de Pessi et al. (2015) (807f/1050r) para grupos taxonômicos de interesse, considerando “0 mismatch” e “1 mismatch”. Fonte: ARB PT - SILVA (<https://www.arb-silva.de/search/testprime/>) (LUDWIG et al., 2004).

Grupo taxonômico	515f/806r		807f/1050r	
	0 mismatch (%)	1 mismatch (%)	0 mismatch (%)	1 mismatch (%)
<b>Archaea</b>	52,9%	94,6%	19,4%	83,1%
<i>Euryarchaeota</i>	87,8%	96,2%	1,6%	81,6%
<i>Methanomicrobia</i>	89%	95,2%	0,2%	83,2%
<i>Thermoplasmata</i>	86,9%	96,1%	5,6%	56,3%
<i>Crenarchaeota</i>	3,3%	94%	13,9%	79,8%
<i>Nanoarchaeota</i>	51,9%	81%	19,1%	68,2%
<i>Thaumarchaeota</i>	50%	94,7%	87,9%	94,1%
<b>Bacteria</b>	86,8%	95%	86,8%	95,4%

Dentre os filos encontrados na amostra de sedimento, o filo *Proteobacteria*, um dos maiores filos dentro do domínio *Bacteria* (GUPTA, 2000; YILMAZ et al., 2016), foi o predominante. Este filo tem ampla diversidade filogenética e fenotípica, sendo encontrado em diversos os ambientes, inclusive em ecossistemas marinhos (ZINGER et al., 2011). Os organismos pertencentes a este filo são gram-negativos e alguns membros são conhecidos por atuarem na etapa de acidogênese da digestão anaeróbia (YAMADA et al., 2006) e serem capazes de fornecerem fontes de carbono adequadas às arqueias metanogênicas. A maior abundância relativa do filo *Proteobacteria* em amostras de sedimento marinho já foi anteriormente reportada na Península Antártica (FRANCO et al., 2017; WANG et al., 2017).

O filo *Bacteroidetes* compreende organismos diversos, desde anaeróbios estritos a aeróbios. São bactérias gram-negativas, apresentam morfologia de bacilos e são conhecidos por degradarem matéria orgânica complexa (KIRCHMAN, 2002). São considerados importantes durante a floração do fitoplâncton, que na Antártica geralmente ocorre durante o verão austral (período de coleta do sedimento utilizado no presente trabalho), em função do degelo (NEDZAREK, 2008) e leva a um maior aporte de matéria orgânica, pois produzem enzimas extracelulares capazes de degradar a parede celular de algas (TEELING, 2002).

O filo *Bacteroidetes* também foi observado em amostras de solo coletadas em transectos de 2 geleiras nas Colinas Larsemann na Antártica e apesar do filo ter sido

observado em todos os pontos ao longo dos transectos, nos pontos de coleta mais próximos das geleiras a abundância era maior (BAJERSKli e WAGNER, 2013).

O filo *Verrucomicrobia* é comumente encontrado em amostras de solo e aparentemente está em menor abundância em ambientes marinhos (BERGMANN et al., 2011; FREITAS et al., 2012), representando uma minoria em sedimento marinhos Antárticos (BOWMAN e MCCUAIG, 2003). Alguns organismos do filo podem utilizar metano como fonte de carbono (POL et al., 2007; CACERE et al., 2017)

Acredita-se que 9% da diversidade celular em sedimentos marinhos corresponde ao filo *Actinobacteria* (BULL et al., 2005). Além disso, o filo já foi observado em amostras de solo em transectos de 2 geleiras nas Colinas Larsemann (Antártica Oriental), sendo o grupo mais abundante e representando 51% em todas as amostras (BAJERSKli e WAGNER, 2013).

O filo *Planctomycetes* apresenta algumas características distintas dentro do Domínio *Bacteria*, como por exemplo o citoplasma dividido em compartimentos e parede celular sem peptidoglicano (FUERST, 2005). Normalmente representam menos de 5% da comunidade do bacterioplâncton na costa marinha (RUSCH et al., 2007; SCHATTEHOFER et al., 2009).

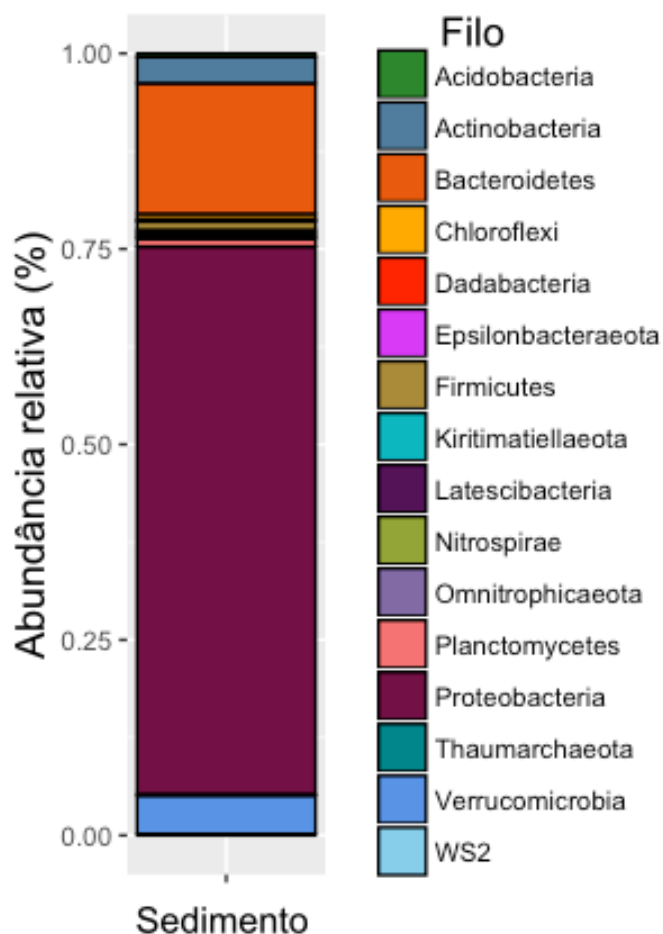
Estudos metagenômicos sugerem que o filo *Acidobacteria* é diverso e distribuído em diversos ambientes (KIELAK et al., 2016), é amplamente encontrado em solos, podendo representar cerca de 52% da comunidade total de bactérias (DUNBAR et al., 2002; SAIT, DAVIS e JANSSEN, 2002), além de serem capazes de sobreviver em condições oligotróficas (WARD et al., 2009). Através de análise de DGGE em amostras de sedimento e solo na Península Fildes (Antártica), Foong, Ling e González (2010) observaram que o filo *Acidobacteria* era o terceiro mais abundante (13,1%), ficando atrás de *Bacteroidetes* (27,4%) e *Proteobacteria* (25,7%). Apesar da análise de comunidade de amostras de solo e sedimento ser em outra região da Ilha Rei George, o padrão dos filios *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* serem os mais abundantes foi também observado nos dois trabalhos sobre a composição da comunidade nas proximidades da Geleira Wanda (este trabalho, Pessi et. al., 2015).

Meisinger et al. (2007) observaram através de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) que membros da subdivisão 7 e 8 do filo *Acidobacteria* estavam sempre associados com organismos pertencentes às classes *Gammaproteobacteria* ou



*Epsilonproteobacteria*, portanto, acredita-se que existam relações ecológicas entre membros dos filos *Acidobacteria* e *Proteobacteria*. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram esta ideia.

**Figura 7.** Abundância relativa dos filos de bactérias e arqueias presentes na amostra de sedimento coletada próximo à geleira Wanda.



Em relação às classes (Figura 8), as mais abundantes foram *Gammaproteobacteria* (39,4%), *Deltaproteobacteria* (19,5%), *Bacteroidia* (16,0%), *Alphaproteobacteria* (7,4%), *Verrucomicrobiae* (5,2%) e *Acidimicrobiia* (3,7%), enquanto no trabalho de Pessi et al. (2015) as classes mais abundantes foram *Gammaproteobacteria* (31,0%), *Betaproteobacteria* (11,6%), *Thermoplasmata* (10,0%), *Sphingobacteria* (9,1%) e *Flavobacteria* (9,0%).

Alguns membros das classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* são capazes de realizar decomposição de matéria orgânica a partir de algas

(TEELING et al., 2012; KIRCHMAN, 2002). Sabe-se que algas produzem TMA (FUJIWARA-ARASAKI e MINO, 1972), dessa forma, a presença desses grupos no sedimento pode estar relacionada com o fornecimento de TMA ou outros compostos orgânicos às arqueias e outros grupos de bactérias.

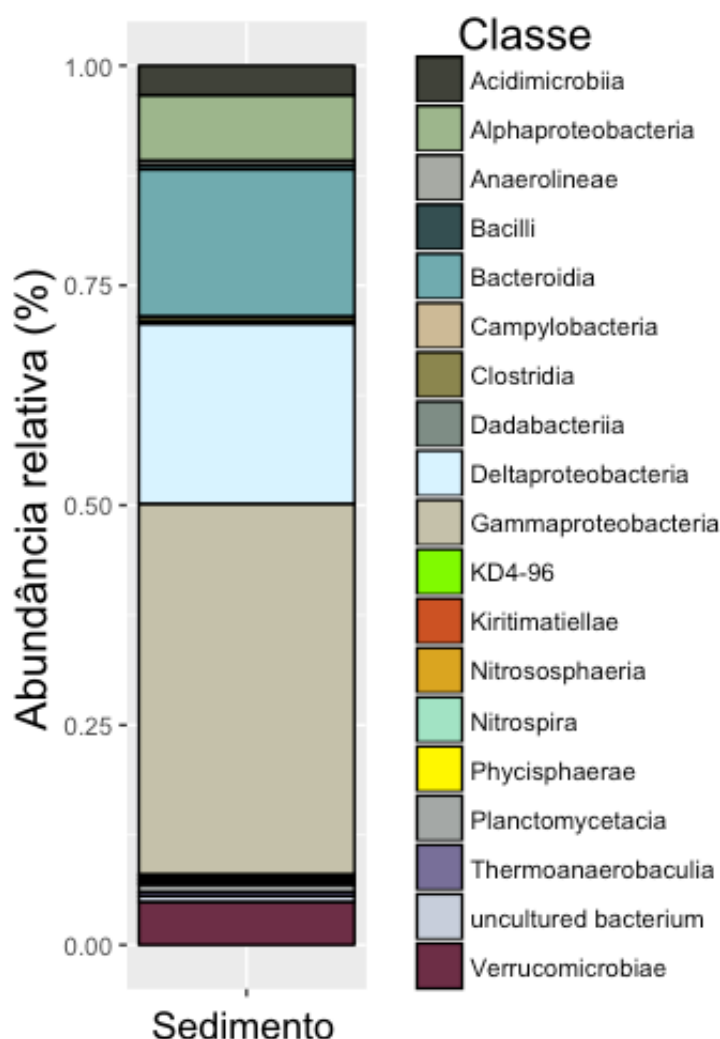
Alguns organismos da classe *Deltaproteobacteria* são conhecidos por realizar redução de sulfato e são encontrados abundantemente na superfície de sedimentos marinhos (BOWMAN, MCCAMMON e DANN, 2003). Bactérias redutoras de sulfato competem com as arqueias metanogênicas por substrato, em especial acetato e H<sub>2</sub> (REEBURGH, 2007). Assim, a metanogênese tende a ocorrer em profundidades onde há concentrações menores de sulfato, sendo possível identificar diferentes zonas biogeoquímicas. Ao longo da coluna de sedimento, a zona de metanogênese tende a ocorrer abaixo da zona de redução de sulfato e na interface entre ambas ocorre a oxidação anaeróbia de metano (AOM) (JØRGENSEN e KASTEN, 2000).

A classe *Bacteroidia* é uma das quatro classes pertencentes ao filo *Bacteroidetes* e apresenta apenas uma ordem, *Bacteroidales*. A descrição da classe é a mesma que a da ordem, dessa forma, membros dessa classe são gram-negativos, anaeróbios ou anaeróbios facultativos e apresentam morfologia fusiforme, bacilos finos ou coco-bacilo (KRIEG et al., 2011).

A classe *Acidimicrobiia*, pertencente ao filo *Actinobacteria*, foi descrita com base no gene rRNA 16S (NORRIS, 2015). Zhang et al. (2016) observaram através de pirosequenciamento 454 que a classe *Acidimicrobiia* era a segunda mais abundante em torno de 5 geleiras na China, representando cerca de 10% da abundância relativa. Cleary et al. (2017) ao analisarem a comunidade de bactérias em sedimentos coletados em diferentes profundidades de ambiente estuarino, observaram que a classe *Acidimicrobiia* foi mais abundante em sedimentos superficiais que em sedimentos profundos.

Organismos pertencentes à classe *Verrucomicrobiae* são gram-negativos, apresentam peptidoglicano na parede celular e algumas espécies possuem fímbria e prosteca, um apêndice celular que é extensão da membrana celular (HEDLUND et al., 1997). São encontrados em ambientes marinhos, de água doce e no trato digestivo de alguns vertebrados, inclusive humanos (HEDLUND, 2015).

**Figura 8.** Abundância relativa das classes de bactérias e arqueias presentes na amostra de sedimento coletada próximo à geleira Wanda.



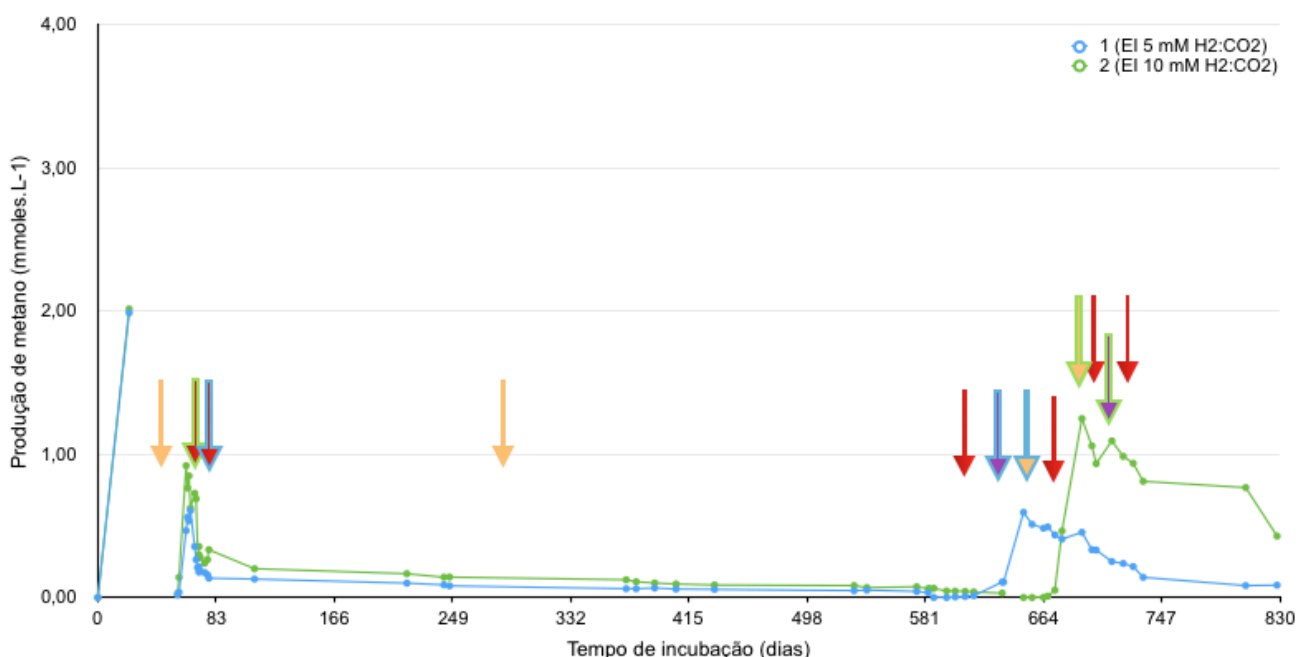
## 5.2 Produção de metano e caracterização morfológica das culturas de enriquecimento inicial (culturas 1 e 2)

As culturas de enriquecimento inicial 1 e 2 foram inoculadas diretamente do sedimento e a produção de metano (Figura 9) foi observada após vinte e dois dias de incubação, correspondendo a 1,988 mmoles.L<sup>-1</sup> (44,5%) e 2,015 mmoles.L<sup>-1</sup> (45,1%) de metano, respectivamente (RAFAEL, 2015). Apesar da cultura 1 ter metade da concentração dos substratos da cultura 2, neste primeiro momento a produção de metano foi praticamente igual, indicando possivelmente a presença de substratos metanogênicos no sedimento de inóculo.

observada após 65 dias de incubação para a cultura 1 correspondendo a 0,606 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (13,6%) e 62 dias para a cultura 2 correspondendo a 0,921 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (20,6%), valores inferiores ao observado antes da realimentação. Entretanto, neste momento a maior produção de metano foi realizada pela cultura com maior concentração dos substratos. Após 69 dias de incubação a concentração de metano na atmosfera dos frascos começou a diminuir e estabilizou-se.

Após 583 dias de incubação, foi realizada realimentação e troca de atmosfera. A cultura 1 voltou a produzir metano 60 dias após a realimentação, enquanto a cultura 2 só voltou a produzir metano após 97 dias de incubação. O pico de produção correspondeu a 0,595 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (13,3%) e 1,25 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (28,0%), para as culturas 1 e 2, respectivamente. Desse modo, foram retiradas amostras tanto para extração e sequenciamento de DNA quanto para realizar roll-tube, visando isolar arqueias metanogênicas.

**Figura 9.** Produção de metano pelas culturas de enriquecimento inicial 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e enriquecimento inicial 2 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA e as setas roxas indicam o momento de retirada de amostra para inóculo em roll-tube. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.

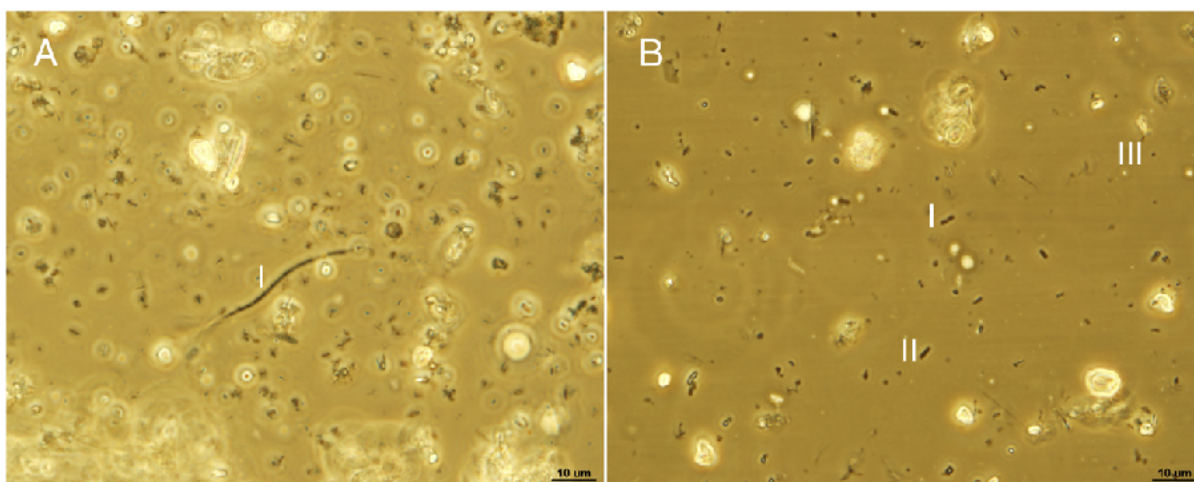


Gibb e Hatton (2004) quantificaram a concentração de trimetilamina e outros compostos metilados na coluna d'água na costa da Península Antártica durante janeiro e fevereiro de 1999, chegando a concentração máxima de  $1,6 \cdot 10^{-6}$  mmoles.L<sup>-1</sup>, demonstrando que há a presença desse substrato no ambiente o que pode justificar a preferência pela trimetilamina pelas culturas e rápida resposta de produção de metano.

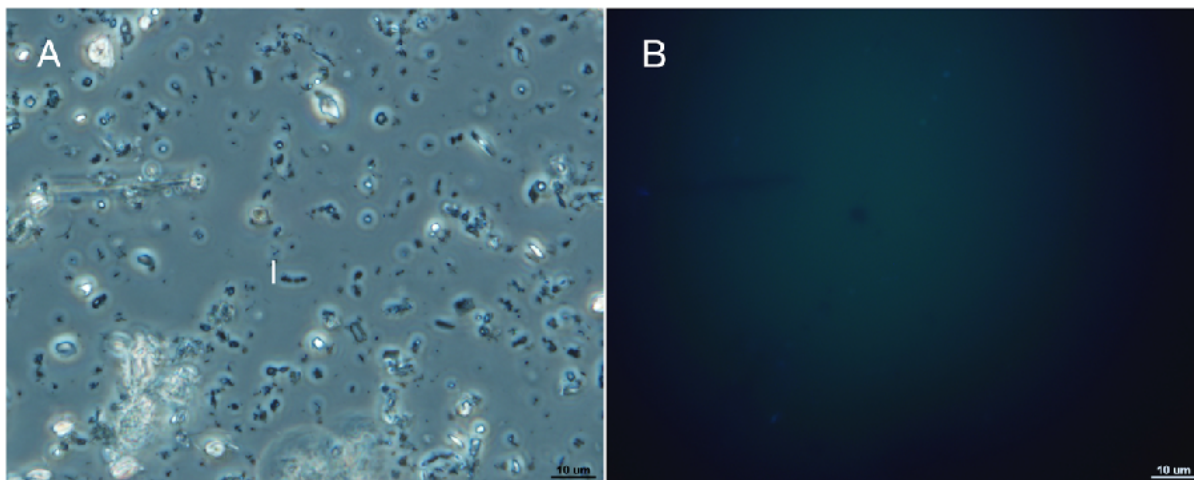
As análises em microscópio de contraste de fase e fluorescência revelaram algumas alterações no padrão da composição das comunidades, sendo concomitantes com as alterações na produção de metano. Durante o período de estabilização da produção de metano, os bacilos foram observados em maior abundância (Figura 10), enquanto no período de maior concentração de metano na atmosfera dos frascos (Figura 11), foram encontrados em maior abundância os cocos irregulares.

No geral, as análises microscópicas revelaram uma grande diversidade de morfologias tanto fluorescentes quanto não fluorescentes, na presença ou ausência de metano.

**Figura 10.** Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) com 596 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo comprido sob contraste de fase. (B) (I) Par de bacilo; (II) bacilo escuro e (III) coco escuro sob contraste de fase.

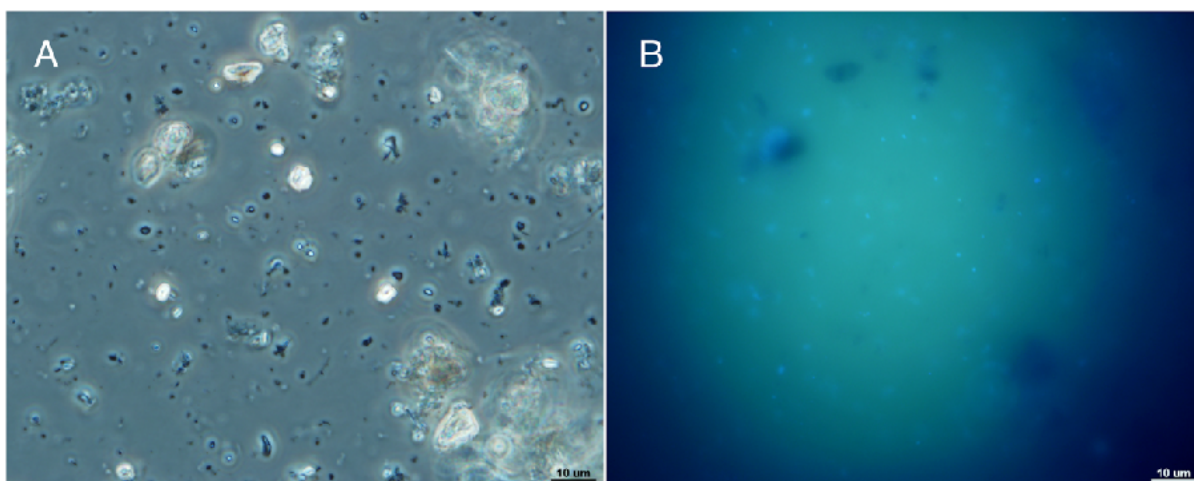


**Figura 11.** Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 692 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Dois pares de bacilos sob contraste de fase. (B) Sob luz UV, indicando que as morfologias presentes não são fluorescentes.



As culturas de enriquecimento inicial apresentavam bastante sedimento, o que dificultou a observação sob contraste de fase, sendo possível identificar os cocos apenas pela fluorescência (Figura 12).

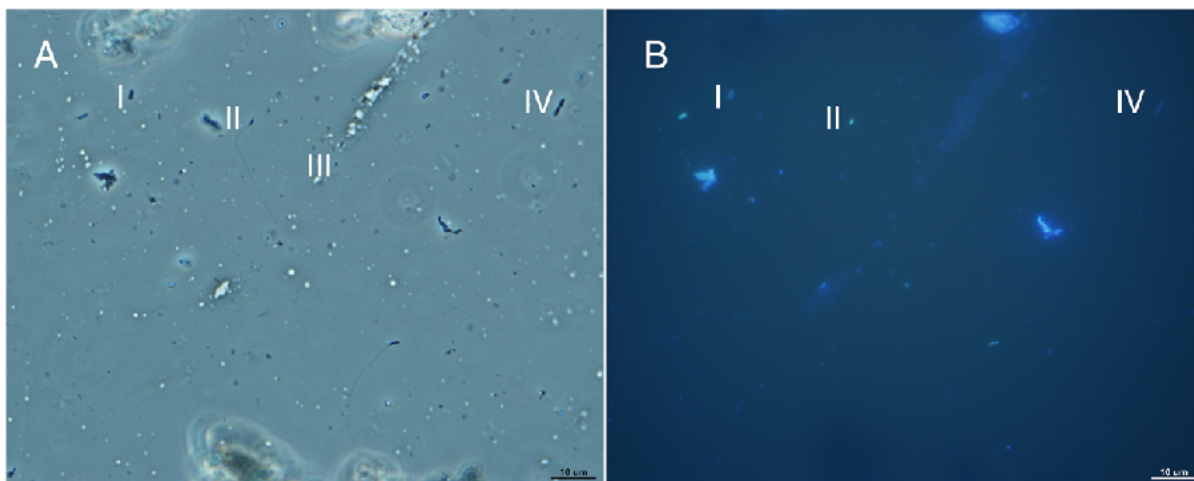
**Figura 12.** Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 2 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 692 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) Cocos sob contraste de fase. (B) Cocos fluorescendo sob luz UV.



Os bacilos com flagelo (Figura 13. IV) foram observados apenas na cultura 2 aos 729 dias de incubação.



**Figura 13.** Morfologias presentes na cultura de enriquecimento inicial 2 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 729 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo; (II) Bacilo com flagelo; (III) Coco; (IV) Diplobacilo sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo; (II) Bacilo com flagelo e (V) Diplobacilo; fluorescendo sob luz UV.



### 5.3 Produção de metano e caracterização morfológica das culturas do repique 1 (R1)

O repique 1 (R1) foi feito a partir das culturas de enriquecimento inicial aos 56 dias de incubação. A produção de metano pelas culturas do R1, exceto as que continham apenas metanol como fonte de substrato (culturas 5 e 9) também ocorreu num curto período de incubação, após seis dias de incubação estas culturas já apresentaram produção de metano.

Um padrão observado inicialmente no enriquecimento de algumas dessas culturas foram alterações na produção de metano, picos de produção seguido de quedas, o que demonstrava algum tipo de variação na condição da própria cultura, seja biótica como por exemplo alteração na composição da comunidade ou algum fator abiótico, como a produção de algum intermediário tóxico para as arqueias metanogênicas que posteriormente era degradado.

#### 5.3.1 Repiques alimentados com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ e $N_2:CO_2$ (culturas 7 e 8)

No início da incubação, a cultura 7 produziu  $2,05 \text{ mmoles.L}^{-1}$  de metano (45,8%) após seis dias de incubação. E a cultura 8, que diferia da 7 apenas pelo gás presente na atmosfera do frasco, produziu  $1,25 \text{ mmoles.L}^{-1}$  de metano (28,1%) (Figura 14).

Após a primeira realimentação e troca de atmosfera que ocorreu aos 13 dias de incubação, ambas as culturas começaram a produzir metano no mesmo período. A cultura 7 atingiu sua produção máxima de metano aos 187 dias de incubação, correspondendo a 3,44 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (77,0%), enquanto a cultura 8 produziu 1,80 mmoles.L<sup>-1</sup> (40,4%) em 322 dias de incubação.

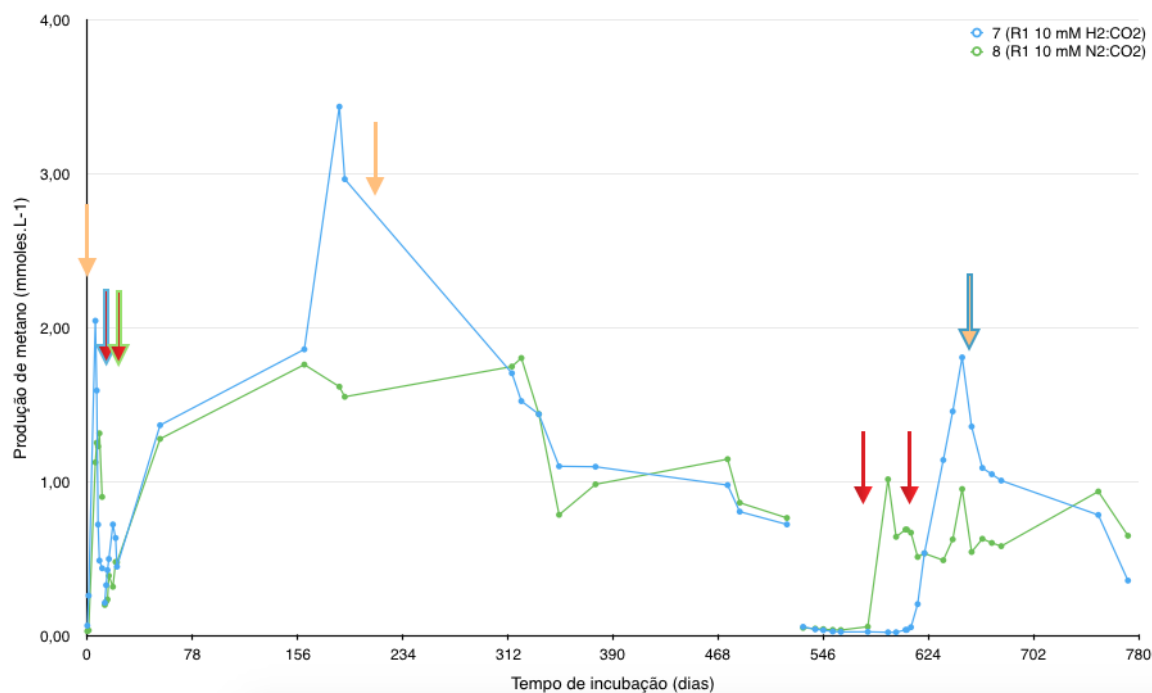
Após um longo período de incubação, uma segunda realimentação das culturas foi feita aos 527 dias de incubação. A cultura 8 iniciou a produção de metano, em um menor período de tempo (597 dias de incubação), mas produziu no máximo 0,952 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (21,3%), enquanto a cultura 7 voltou a produzir metano aos 616 dias de incubação, mas produziu 1,81 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (40,5%).

O padrão de maior produção de metano pela cultura contendo hidrogênio na atmosfera foi mantido. Entretanto, após a segunda realimentação, as culturas produziram aproximadamente a metade do que foram capazes de produzir no início do inóculo, fato que pode estar relacionado a uma alteração na comunidade com o tempo de incubação ou a perda de componentes no meio de cultura importantes para o crescimento dos grupos metanogênicos.

Apesar das culturas 7 e 2 (R1 10 mM H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> e EI 10 mM H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) apresentarem as mesmas condições de cultivo, a cultura 7 produziu mais metano, indicando o enriquecimento de uma população metanogênica ao longo da incubação.

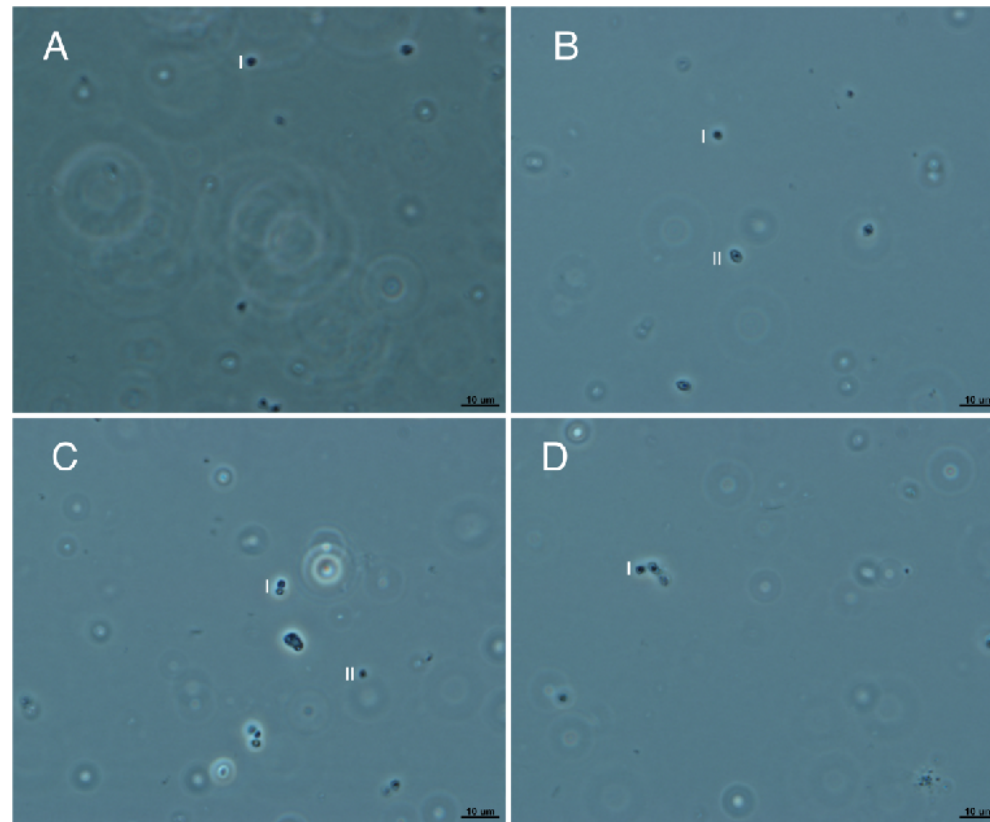


**Figura 14.** Produção de metano pelas culturas 7 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul e 8 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.

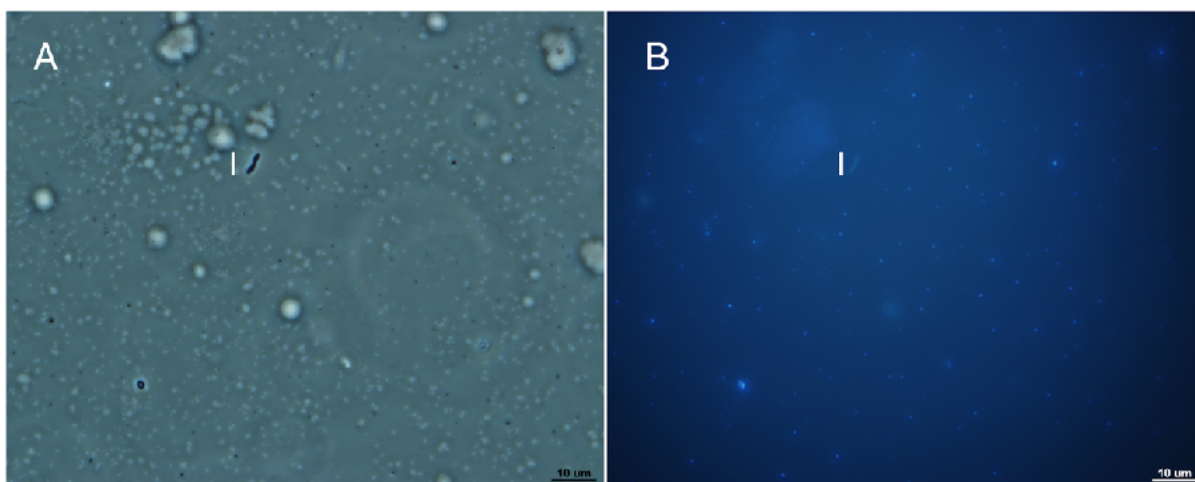


Mesmo tendo a mesma concentração de ambos substratos, a cultura 8 apresentou maior diversidade de morfologias que a cultura 7. Em um dos períodos observados (551 dias de incubação) a cultura 7 apresentou maior abundância de cocos e células esféricas translúcidas (Figura 15), em outro período eram observadas células fluorescentes (Figura 16). A comunidade da cultura 8 foi composta principalmente de pequenos cocos escuros, estreptococos, estreptobacilos, bacilos escuros, bacilos finos com e sem grânulos (Figura 17).

**Figura 15.** Morfologias presentes na cultura 7 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 551 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro. (B) (I) Coco escuros e (II) Célula esférica translúcida. (C) (I) Par de cocos irregulares e (II) Célula esférica translúcida sob contraste de fase. (D) (I) Células esféricas translúcidas; sob contraste de fase.

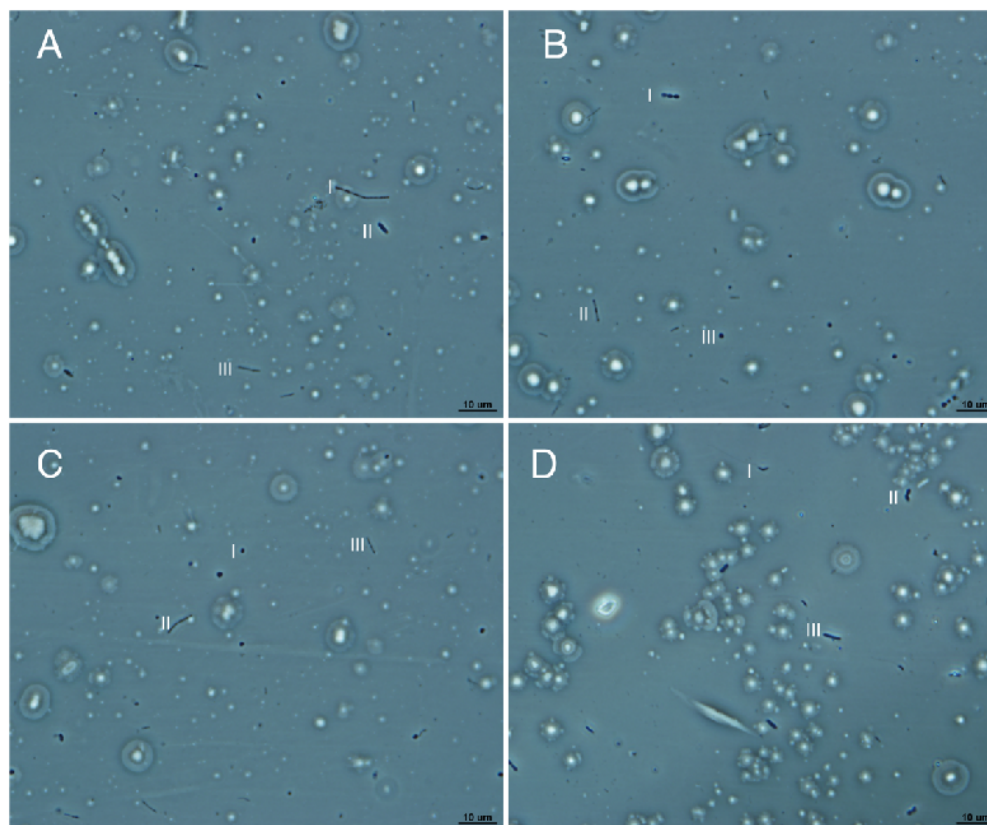


**Figura 16.** Morfologias presentes na cultura 7 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 610 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro sob contraste de fase. (B) (I) Diplobacilo escuro fluorescendo sob luz UV.

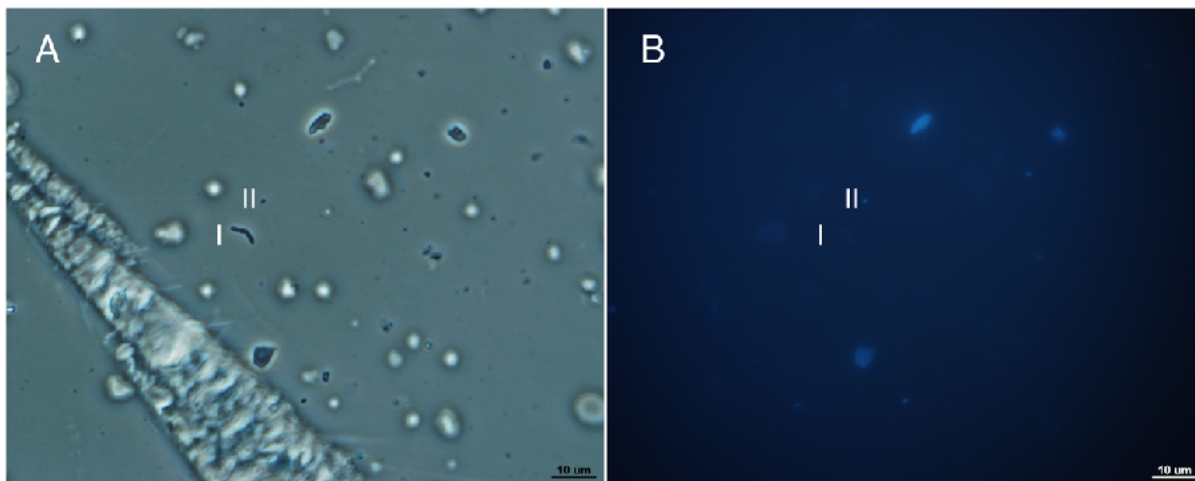


Algumas morfologias como bacilos finos com grânulos e bacilo com flagelo foram apenas observadas na cultura 8. A fluorescência de alguns cocos irregulares era mais forte quando comparada com a dos bacilos. (Figura 18. B)

**Figura 17.** Morfologias presentes na cultura 8 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 551 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo fino. (II) Bacilo escuro e (II) Bacilo fino com grânulo. (B) (I) Estreptococo; (II) Bacilo fino e (III) Coco escuro; (C) (I) Coco escuro; (II) Bacilo fino e (III) Diplobacilo. (D) (I) Bacilo com flagelo; (II) Diplobacilo escuro e (III) Bacilos escuros; sob contraste de fase.



**Figura 18.** Morfologias presentes na cultura 8 (10 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 610 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos; (II) Coco. (B) (I) Bacilo e (II) Coco fluorescendo sob luz UV.



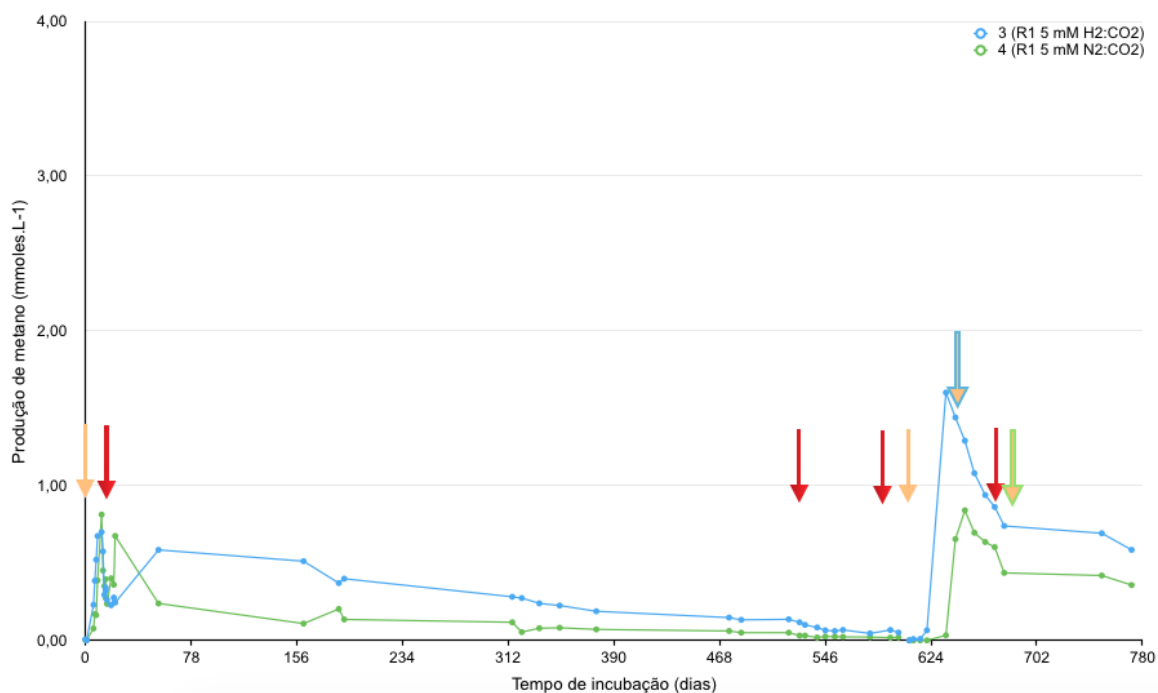
### 5.3.2 Repiques alimentados com 5 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ e $N_2:CO_2$ (culturas 3 e 4)

As culturas nas quais os substratos estavam a uma concentração de 5 mM (3 e 4), apresentaram comportamento semelhante em relação à produção de metano. Entretanto, a cultura que começou a produzir metano mais rapidamente foi a 3, comportamento também observado após realimentação que ocorreu aos 607 dias de incubação, na qual a cultura 3 produziu metano aos 621 dias, enquanto a cultura 4 só voltou a produzir metano aos 642 dias de incubação (Figura 19).

Após 12 dias de incubação houve o primeiro pico de produção de metano, correspondendo a 0,699 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (15,7%) e 0,812 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (18,2%) para as culturas 3 e 4, respectivamente, estes valores foram menores quando comparados com a produção máxima pelas culturas que continham o dobro da concentração destes substratos.

Após a realimentação realizada aos 607 dias de incubação, entretanto, foram observados valores maiores na produção de metano, 1,60 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (35,9%) aos 635 dias e 0,840 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (18,8%) aos 649 dias de incubação para as culturas 3 e 4, respectivamente. Ao contrário do que foi observado no início da incubação, a cultura contendo hidrogênio na atmosfera, produziu mais metano, o que também foi observado na cultura que continha 10 mM dos substratos.

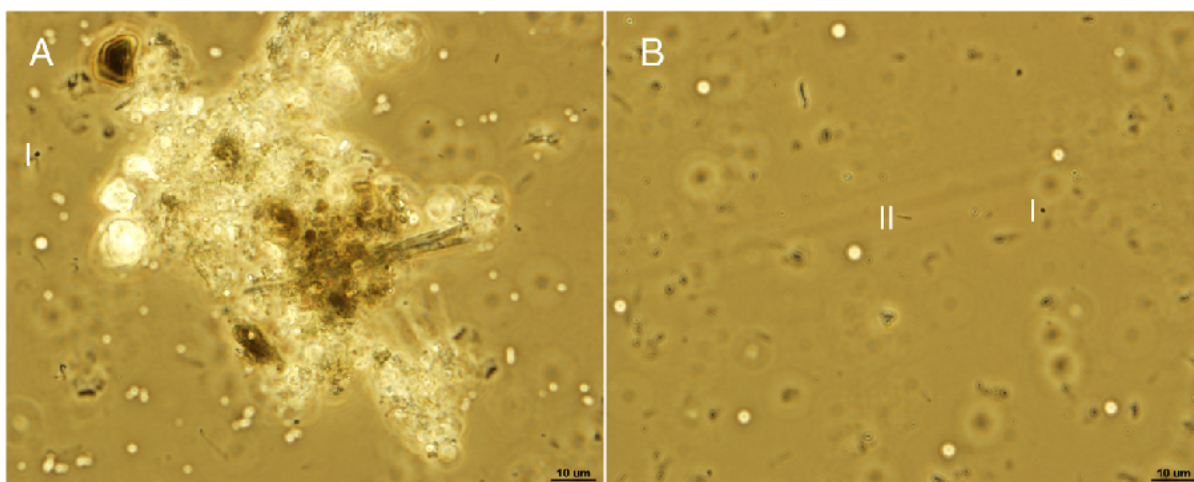
**Figura 19.** Produção de metano pelas culturas 3 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul e 4 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.



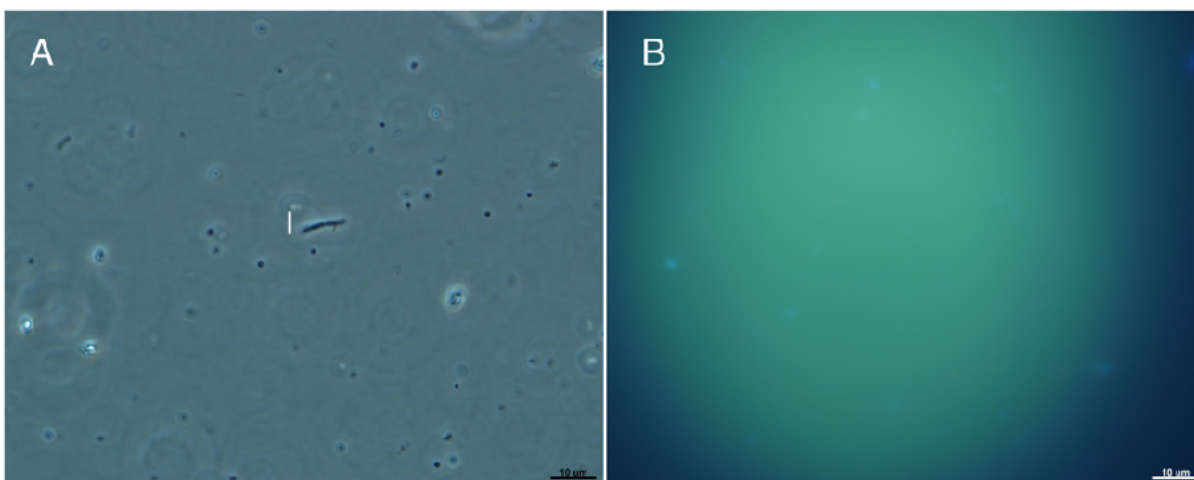
No período de 540 dias de incubação havia pouco metano na atmosfera e a comunidade das culturas 3 e 4 diferiam morfológicamente. Na cultura 3 havia cocos escuros e bacilos (Figura 20) aos 540 dias de incubação, enquanto aos 660 dias de incubação, período no qual havia metano na atmosfera, foi observada uma maior quantidade de cocos escuros (Figura 21), enquanto na cultura 4 havia predomínio de bacilos, estreptobacilos, bacilos com flagelo e bacilos com grânulos (Figura 22 A).



**Figura 20.** Morfologias presentes na cultura 3 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 540 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro (B) (I) Coco escuro e (II) Bacilo; sob contraste de fase.

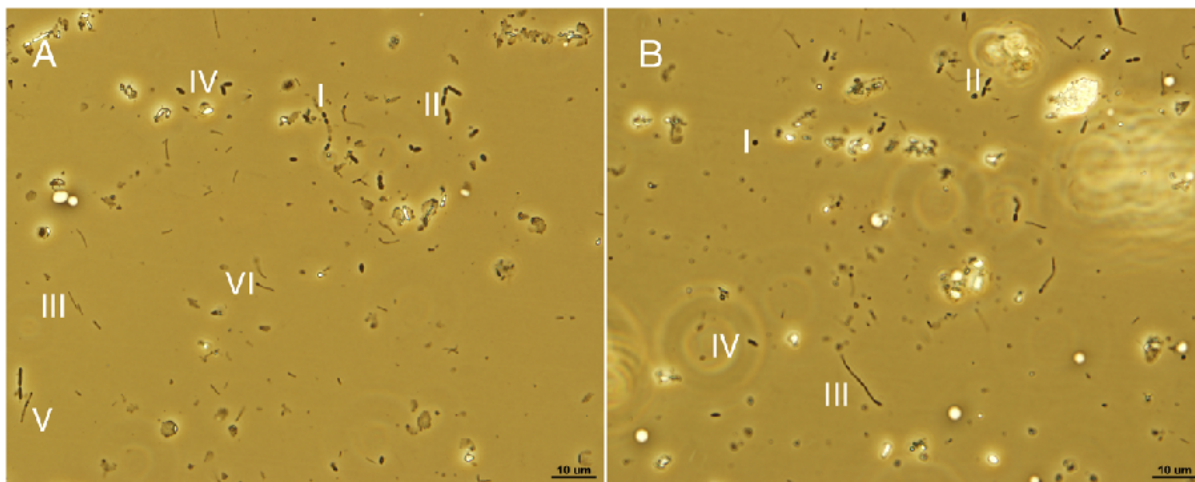


**Figura 21.** Morfologias presentes na cultura 3 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 660 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo e diversos cocos escuros sob contraste de fase. (B) Sob luz UV, indicando que as morfologias presentes não são fluorescentes.

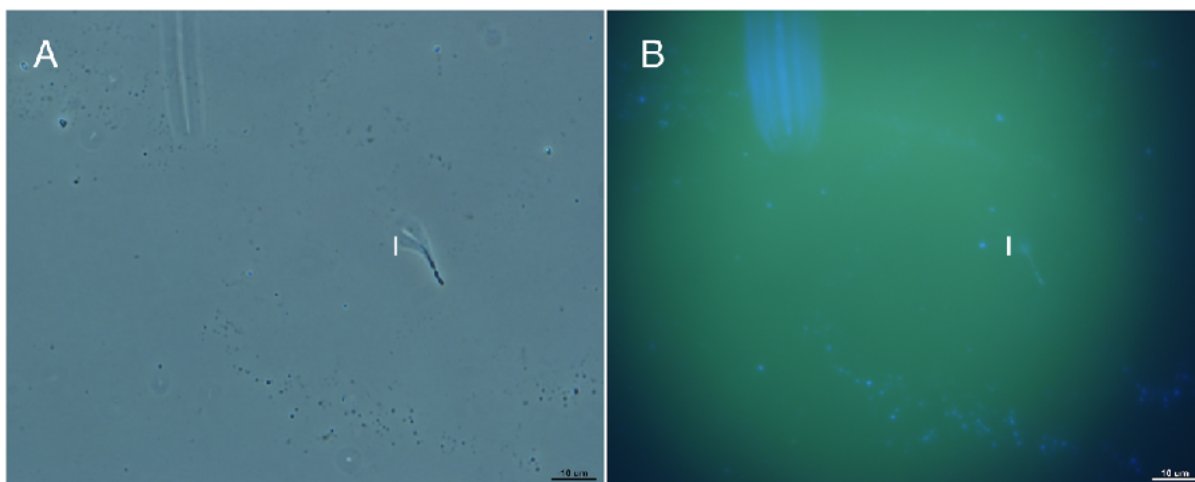


Entretanto, ao serem analisadas aos 660 dias de incubação (após 53 dias da realimentação), período no qual ambas culturas produziam metano, as comunidades foram morfológicamente similares, apresentando bacilos escuros (fluorescentes), estreptobacilos e cocos escuros (Figuras 21 e 23),

**Figura 22.** Morfologias presentes na cultura 4 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 540 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo. (II) Pares de bacilos; (III) Bacilo fino. (IV) Bacilos escuros; (V) Bacilo fino com grânulo e (VI) Bacilo com flagelo. (B) (I) Coco escuro; (II) Diplobacilo; (III) Bacilo com flagelo e (IV) Bacilo escuro; sob contraste de fase.



**Figura 23.** Morfologias presentes na cultura 4 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 660 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo sob contraste de fase. (B) (I) Estreptobacilo fluorescendo sob UV.



### 5.3.3 Repiques alimentados com 10 mM e 20 mM de metanol, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ (culturas 5 e 9)

As culturas que continham apenas metanol como fonte de substrato (5 e 9), começaram a produzir metano após 54 dias de incubação. A produção máxima de metano por ambas culturas foi atingida após 161 dias de incubação. A cultura com maior concentração de substrato (cultura 9) também foi a que mais produziu metano, correspondendo a  $0,961 \text{ mmols.L}^{-1}$  de metano (21,5%), enquanto a cultura com

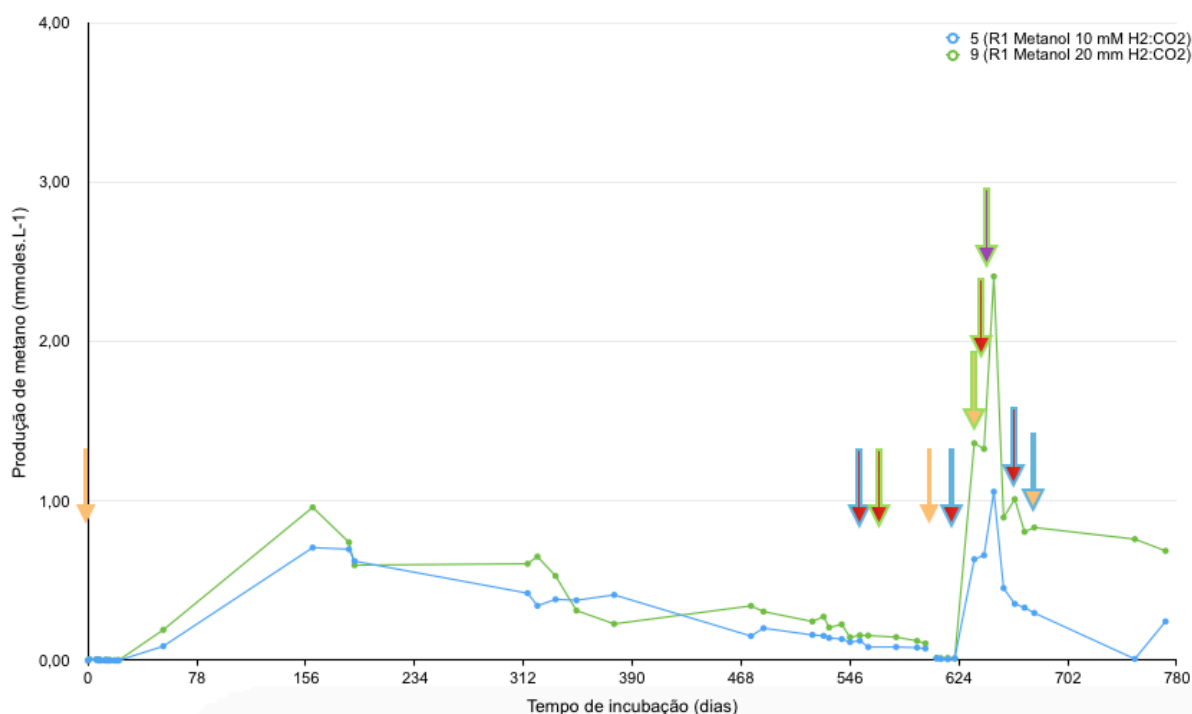


metade da concentração de substrato produziu 0,709 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (15,9%) (Figura 24).

O maior tempo de resposta à produção de metano indica que a trimetilamina é um substrato preferencial das arqueias encontradas no sedimento marinho nas proximidades da geleira Wanda.

Após realimentação que ocorreu aos 607 dias de incubação, ambas culturas produziram metano em 28 dias. A concentração máxima de metano produzido pela cultura 5 foi de 1,06 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (23,7%) e 2,41 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (54,0%) pela cultura 9, ambas aos 649 dias de incubação. Assim como no início do inóculo, após a realimentação, a cultura contendo 20 mM de metanol produziu mais metano quando comparado com a cultura contendo 10 mM do substrato.

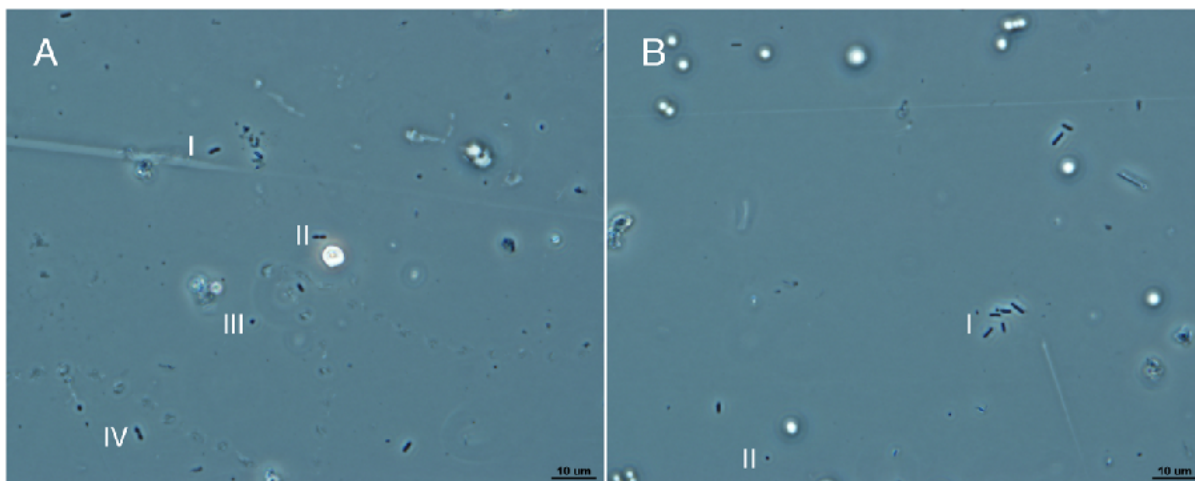
**Figura 24.** Produção de metano pelas culturas 5 (10 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em azul e 9 (20 mM de metanol sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA e a seta roxa indica o momento de retirada de amostra para inóculo em roll-tube. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.



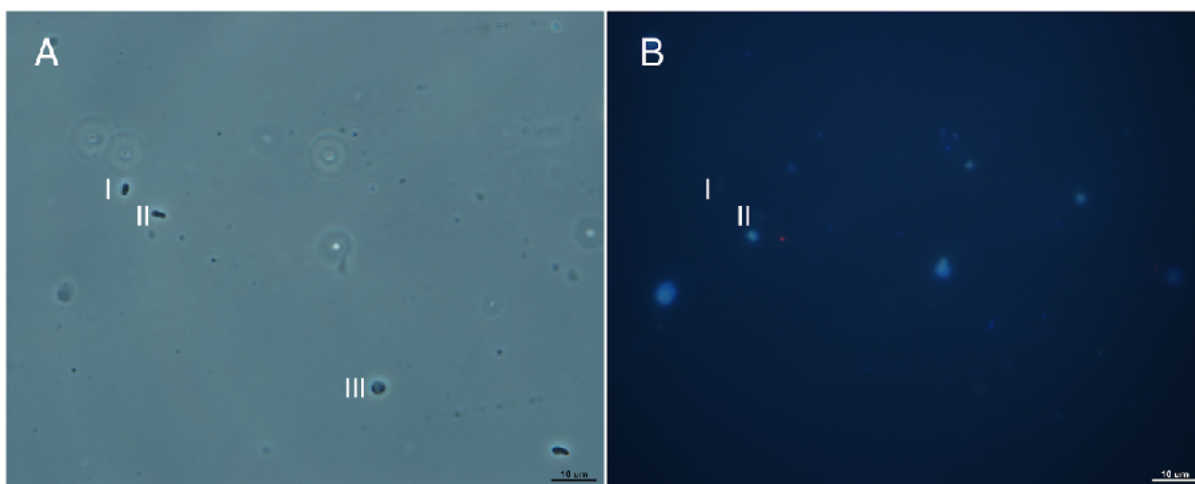
Ao contrário das culturas contendo ambos substratos, foram observados bacilos em maior abundância que cocos (Figura 25). Entretanto, assim como na

cultura 2, foram observadas células esféricas translúcidas, mas de diferente tamanho (Figura 26).

**Figura 25.** Morfologias presentes na cultura 5 (10 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 610 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo escuro; (II) Diplobacilo; (III) Coco escuro e (IV) Diplobacilo. (B) (I) Bacilos escuros e (II) coco escuro; sob contraste de fase.

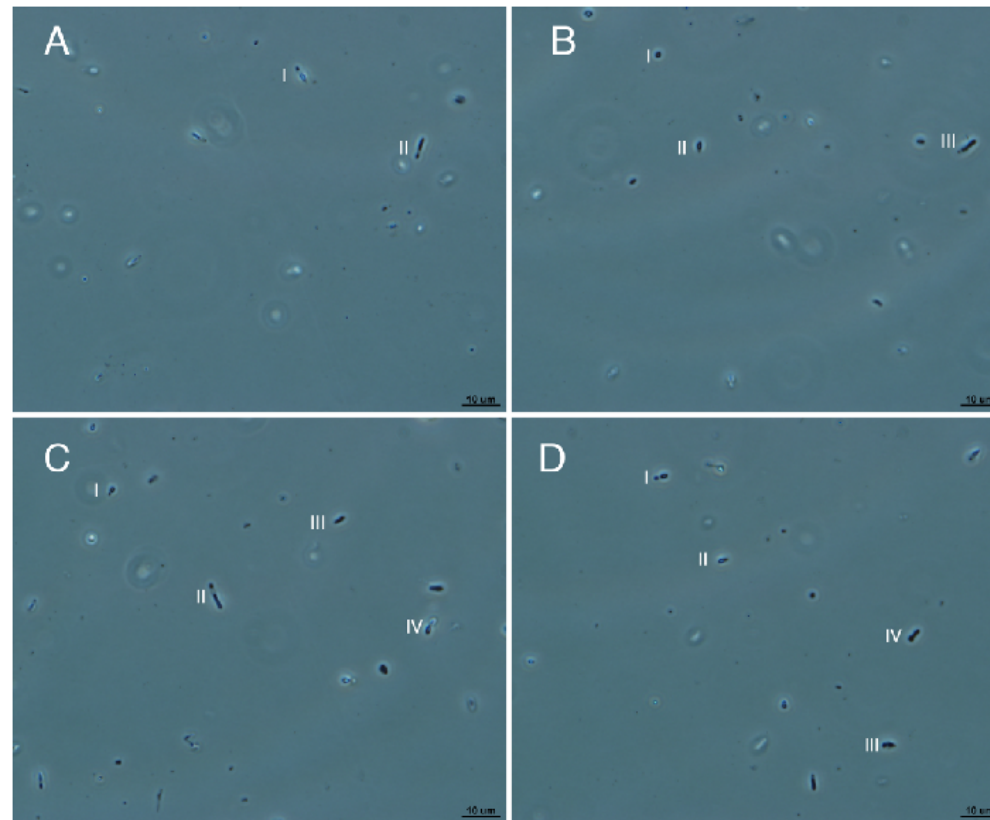


**Figura 26.** Morfologias presentes na cultura 5 (10 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 660 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I); (II) Bacilo escuro e (III) Células esféricas translúcidas; sob contraste de fase. (B) (I) e (II) Bacilos escuros fluorescendo sob UV.



As culturas contendo apenas metanol como fonte de substrato apresentaram uma certa morfologia característica de bacilos de diferentes tamanhos com “espaços” em diferentes posições (Figura 27).

**Figura 27.** Morfologias presentes na cultura de 9 (20 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 636 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) e (II) Bacilos com “espaços” em diferentes posições. (B) (I) Coco escuro; (II) e (II) Bacilo com “espaço”. (C) (I) Bacilo escuro; (II) Bacilos com “espaços” em diferentes posições; (III) Bacilo escuro e (IV) Diplobacilo. (D) (I) Bacilo com “espaços” em diferentes posições; (II) Bacilo; (III) Par de cocos e (IV) Bacilo escuro; sob contraste de fase.



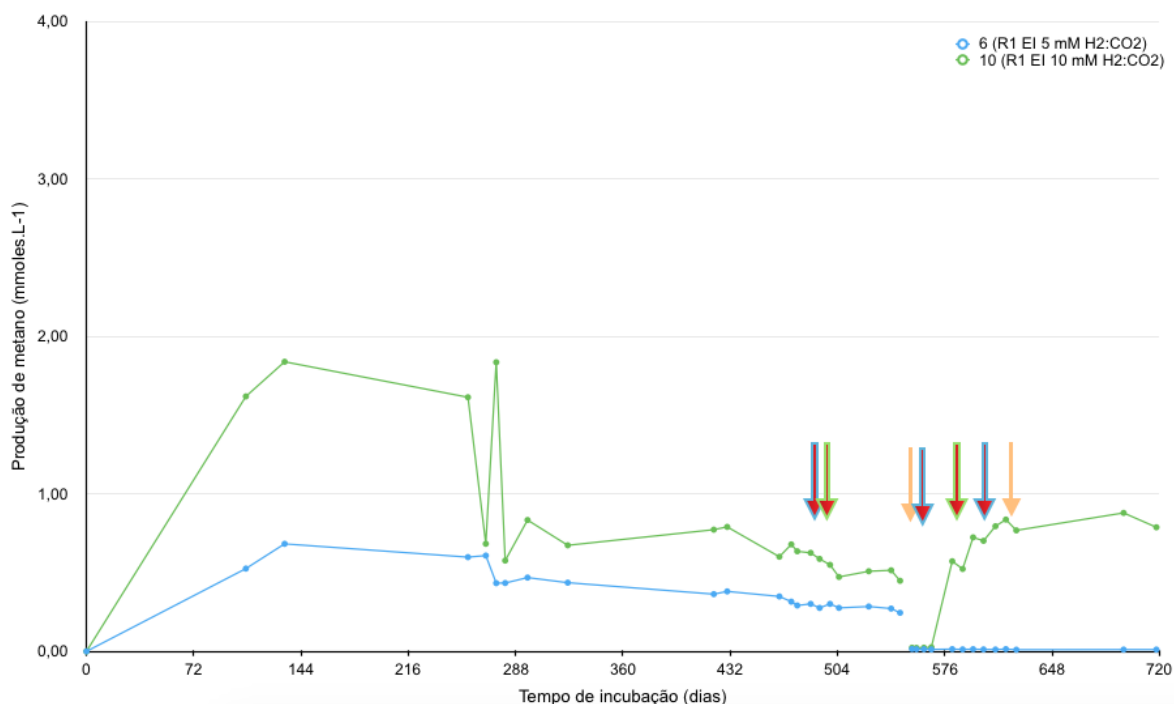
#### 5.3.4 Repiques alimentados com 5 mM e 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ (culturas 6 e 10)

Novos repiques das culturas de enriquecimento inicial foram feitos após 110 dias de incubação, período no qual ocorria queda na produção de metano. A produção de metano foi observada após 107 dias de incubação. O pico de produção de metano correspondeu a 0,608 mmol.L<sup>-1</sup> de metano (13,6%) pela cultura 6 e 1,84 mmol.L<sup>-1</sup> de metano (41,1%) pela cultura 10 (Figura 28).

Apesar do inóculo ter sido realizado num período de queda na produção de metano pelas culturas 1 e 2, o padrão de produção de metano foi similar nos repiques. Assim como os enriquecimentos iniciais, a cultura contendo 10 mM dos substratos, produziu mais metano.

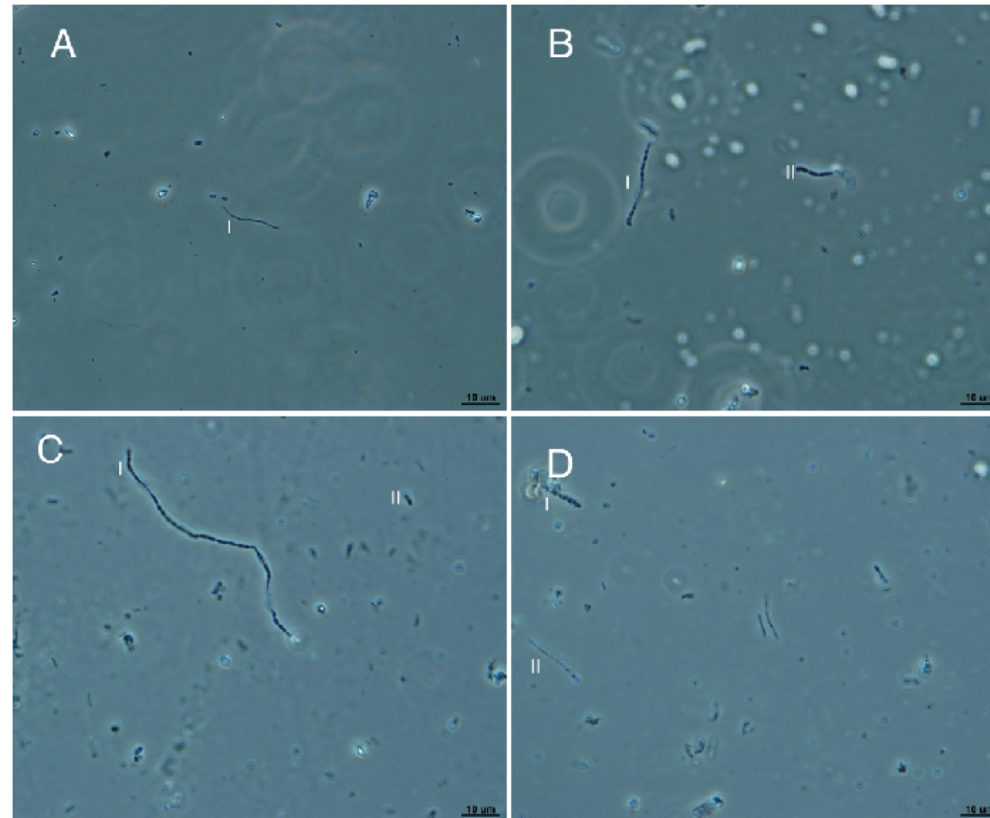
Após realimentação, a cultura 10 voltou a produzir metano em um menor período de tempo, correspondendo a 0,702 mmol.L<sup>-1</sup> de metano (15,7%), valor menor do que o observado no início da incubação. Até o presente momento, a cultura 6 não produziu metano e não apresentou queda na concentração de hidrogênio presente na atmosfera.

**Figura 28.** Produção de metano pelas culturas 6 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul e 10 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.



No primeiro período de análise morfológica, a produção de metano tinha caído e estava estabilizada. Foi observada uma maior diversidade de bacilos quando comparada com a de cocos, assim como observado no repique anterior. Entretanto, havia uma maior diversidade de morfologias de bacilos. Foram observados bacilos escuros, bacilos finos, pares de bacilos, estreptobacilos e bacilos com grânulos (Figura 29).

**Figura 29.** Morfologias presentes na cultura 6 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 497 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo fino sob contraste de fase. (B) (I) ; (II) Estreptobacilos. (C) (I) Estreptobacilos e (D) (I) Bacilo grosso segmentado; (II) Bacilo com grânulos; sob contraste de fase.

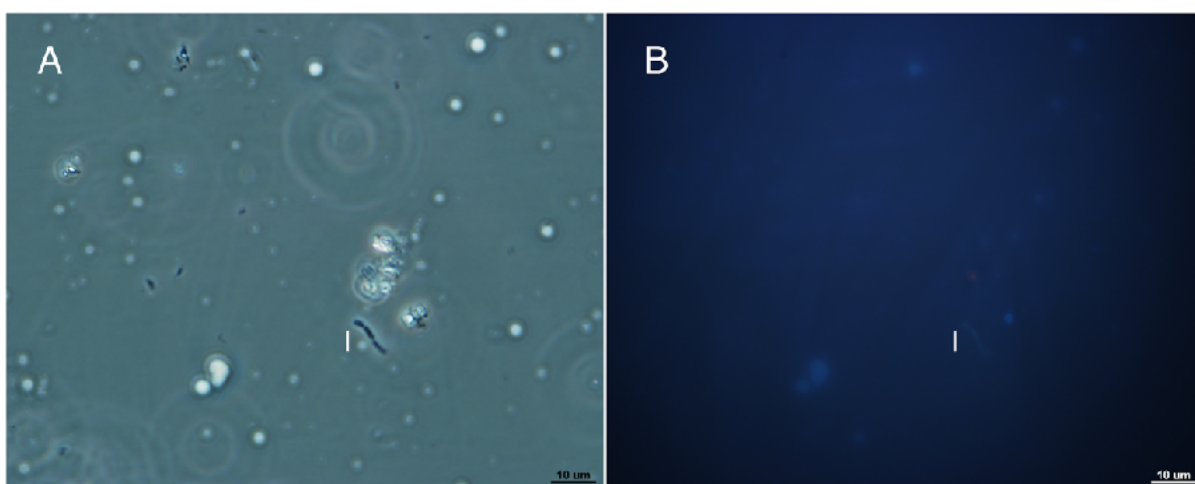




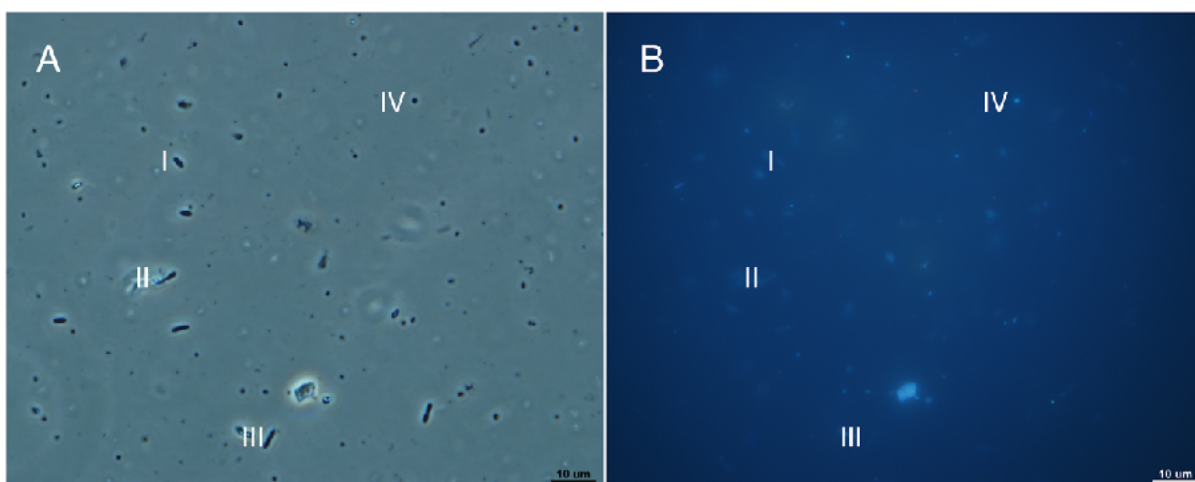
Apesar de não haver produção de metano aos 556 dias de incubação, a cultura 6 apresentava morfologias fluorescentes (Figura 30).

A segunda análise morfológica da cultura 10 foi concomitante com o período de produção de metano, dessa forma, foram observadas diversas morfologias fluorescentes (Figura 31). Assim como em culturas anteriores, a fluorescência dos cocos era mais forte que a dos bacilos (Figura 31. B).

**Figura 30.** Morfologias presentes na cultura 6 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 556 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo sob contraste de fase. (B) (I) Estreptobacilo fluorescendo sob UV.



**Figura 31.** Morfologias presentes na cultura 10 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 582 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo escuro; (II) Par de bacilo; (III) Bacilo escuro e (IV) Coco escuro sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo escuro; (II) Par de bacilo; (III) Bacilo escuro e (IV) Coco escuro fluorescendo sob UV.



### 5.3.5 Análise de sequenciamento das culturas de enriquecimento inicial e das culturas selecionados do repique 1 (R1)

A fim de obter maiores informações sobre a diversidade filogenética das culturas, foram enviadas amostras de DNA das culturas 1, 2, 7 e 8 para sequenciamento.

Na primeira análise, foram encontradas 5.537.336 sequências que após análise foram classificadas em 33 OTUs. Na análise das sequências foram consideradas apenas aquelas com abundância relativa superior a 0,1%. O filo *Euryarchaeota*, ao qual pertencem as arqueias metanogênicas, foi atribuído a 99,9% (culturas 1, 2 e 7) ou 100% (cultura 8) das sequências obtidas. As amostras para extração de DNA das culturas 1 e 2 foram retiradas em 257 dias de incubação, período no qual o metano já tinha começado a diminuir na atmosfera e estava estabilizado. Enquanto as culturas 7 e 8 encontravam-se no pico de produção de metano aos 201 dias de incubação.

Ao analisar as sequências a nível de gênero observou-se que nas culturas 1, 2 e 8 arqueias pertencentes ao gênero *Methanococcoides* eram mais abundantes (99,9%, 99,0% e 99,9%, respectivamente) que na cultura 7, na qual arqueias pertencentes ao gênero *Methanosarcina* representavam 89,5% da abundância relativa.

As culturas 7 e 8 foram inoculadas a partir da cultura 2 e possivelmente a presença de hidrogênio na cultura 7 possibilitou condições favoráveis ao crescimento de arqueias pertencentes ao gênero *Methanosarcina*, visto que estes organismos podem produzir metano através das vias hidrogenotrófica e metilotrófica, enquanto o gênero *Methanococcoides* é exclusivamente metilotrófico.

A via hidrogenotrófica é termodinamicamente mais favorável que a via metilotrófica quando comparada a energia livre ( $\Delta G^\circ$ ) de cada reação. A via hidrogenotrófica apresenta  $\Delta G^\circ = -135$  kJ/mol de metano, enquanto a produção de metano em função de metanol e TMA apresentam  $\Delta G^\circ = -105$  kJ/mol e  $\Delta G^\circ = -74$  kJ/mol de metano, respectivamente (LIU e WHITMAN, 2008).

Na ausência de hidrogênio na cultura sob atmosfera de  $N_2$ , o metabolismo metilotrófico foi a principal opção para a metanogênese. Enquanto sob atmosfera de hidrogênio, além da presença do substrato metilotrófico, a cultura 7 apresentou



maior produção de metano aos 201 dias de incubação em comparação com as demais, indicando que a disponibilidade de dois doadores de elétrons diferentes pode ter permitido a produção simultânea de metano através das vias metilotrófica e hidrogenotrófica. O mesmo pode ter ocorrido nas culturas contendo 5 mM dos substratos (3 e 4), uma vez que a cultura contendo  $H_2:CO_2$  na atmosfera produziu mais metano, podendo ser indício de atividade metilotrófica e hidrogenotrófica na cultura 3.

Em um estudo realizado para avaliar o uso de TMA e outros compostos metilados (HIPPE et al., 1979), culturas de *Methanosarcina barkei* foram enriquecidas com 50 mM dos substratos a 30 °C sob atmosfera de  $N_2:CO_2$  e foi observado que entre metanol e TMA, a maior produção de metano ocorreu na cultura contendo TMA como substrato. A cultura contendo metanol produziu 0,6 mol de metano por mol de substrato, enquanto a cultura contendo TMA produziu 1,87 mol de metano.

Ao se comparar culturas de um mesmo repique (R1), é possível observar que ambos os substratos metilotróficos foram utilizados para produção de metano, mas as culturas alimentadas com TMA apresentaram produção em menos tempo que aquelas alimentadas com metanol. No presente trabalho, as culturas contendo apenas metanol como substrato (10 mM de metanol na cultura 5 e 20 mM de metanol na cultura 9) o máximo de metano produzido foi de 1,06 mmols.L<sup>-1</sup> e 2,41 mmols.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Enquanto as culturas 3 e 7 que continham a mesma concentração final de ambos os substratos (5 mM de metanol e 5 mM de TMA na cultura 1 e 10 mM de metanol e 10 mM de TMA a cultura 2), produziram um máximo 1,60 mmols.L<sup>-1</sup> e 3,44 mmols.L<sup>-1</sup> de metano, respectivamente.

Apesar do trabalho de Hippe et al. (1979) utilizar 50 mM dos substratos e não haver combinação de substratos, é possível observar que a partir da TMA é produzido mais metano, o que também ocorreu com as culturas do presente trabalho. A combinação de substratos (metanol e TMA) não influenciou a produção de metano no início da incubação das culturas, visto que as culturas contendo apenas metanol levaram tempo maior para produzir metano, logo, a produção de metano nas culturas contendo ambos os substratos ocorreu em função da TMA e não do metanol.

Flood (2006) realizou enriquecimentos com TMA e bromoetenosulfonato (BSE) (25 mM e 50 mM, respectivamente) e TMA e  $\text{SO}_4$  (25 mM e 28 mM, respectivamente), ambos sob atmosfera de  $\text{H}_2:\text{CO}_2$ . O BSE inibe a metanogênese, dessa forma, o primeiro enriquecimento tinha a finalidade de avaliar se bactérias eram capazes de crescer utilizando TMA e a adição de sulfato ao outro enriquecimento tinha a finalidade de avaliar se bactérias redutoras de sulfato conseguiam utilizar TMA como doador de elétrons. A análise cromatográfica revelou que o cultivo contendo TMA e BES gerou no máximo 43,2 mM de metano enquanto o cultivo contendo TMA e  $\text{SO}_4$  atingiu máximo de 183,6 mM de metano. Dentre os gêneros de arqueias, *Methanococcoides* foi o mais abundante e o gênero *Desulfovibrio* foi encontrado em ambos enriquecimentos, além do gênero *Fusibacter*. A autora chegou à conclusão de que a cultura contendo TMA e  $\text{SO}_4$  que tinha o propósito de selecionar bactérias redutoras de sulfato que utilizassem TMA, acabou estimulando a metanogênese, entretanto, sulfeto de hidrogênio foi formado, mostrando que a redução de sulfato também ocorreu.

A partir de trabalhos anteriores (HIPPE et al., 1979; FLOOD, 2006; WATKINS et al. 2014; WILLIAMS et al., 2009), é possível observar que tanto o gênero *Methanococcoides*, quanto *Methanosarcina* comumente utilizam compostos metilados, especialmente TMA, como fonte de substrato.

Apesar de representar menos que 0,1% da abundância relativa, foram observadas sequências relacionadas ao gênero *Sphaerochaeta* na cultura 7, além de terem sido observadas morfologias (células esféricas translúcidas) semelhantes ao que foi descrito na literatura para a espécie *Sphaerochaeta associata* (TROSHINA et al., 2015). Esta espécie foi isolada de uma cultura mista de *Methanosarcina mazei* e na cultura 7 foram observadas sequências referentes ao gênero *Methanosarcina* em maior abundância relativa.

Numa segunda análise, foram enviadas amostras de DNA das culturas 7 e 8 (que haviam sido armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) no tempo zero a fim de comparar a composição da comunidade em diferentes períodos, e das culturas 5 e 9 no momento de produção de metano (671 e 645 dias de incubação, respectivamente). Foram obtidas 357.746 sequências que foram classificadas em 98 OTUs.

Nas culturas 7 e 8 no tempo zero de incubação, o filo dominante foi *Firmicutes* (69,0% e 41,0%), seguido por *Euryarchaeota* (26,0% em ambas) e *Proteobacteria* (3,6% e 20,0%) (Figura 32).

O filo *Fusobacteria* foi observado apenas na cultura 8 (12,0%), este filo contém membros gram-negativos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos, fermentadores, possuem morfologia de bacilos (GUPTA e SETHI, 2014) e são normalmente encontrados em sedimentos marinhos (GUTIERREZ et al., 2016).

O filo *Firmicutes* apresenta diversidade de metabolismos e inclusive pode conter gêneros que são redutores de sulfato (ZOUCH et al., 2017). No geral, os organismos pertencentes a este filo são gram-positivos e apresentam morfologia de bacilos ou células esféricas e podem formar endosporos (SEONG et al., 2018). São abundantes em solos e ambientes aquáticos, estando envolvidos na decomposição e reciclagem de matéria orgânica (BAIK et al., 2008). Yilmaz et al. (2016) analisaram bancos de dados de *amplicons* do gene 16S rRNA de amostras marinhas da coluna d'água, aplicando o método candidato a unidade taxonômica (CTU), além de análise da distribuição global desses clados, biogeografia, bem como funções ecológicas e interações com variáveis oceanográficas. Em função dessa análise, foi observado que o filo *Firmicutes* não é normalmente encontrado em altas taxas de abundância relativa em ambientes marinhos. Em relação à distribuição geográfica não houve um padrão determinado, entretanto, algumas dessas sequências eram provenientes de ambientes hipersalinos e duas sequências não identificadas de amostras de mar, desse modo, acredita-se que o filo seja tolerante à salinidade. No sedimento próximo à geleira Wanda o filo estava presente, mas em menor abundância, sendo compatível com o que foi observado por Yilmaz et al. (2016). Entretanto, nas culturas 7 e 8 era o filo mais abundante, indicando que as condições de enriquecimento foram favoráveis a estes organismos.

Ambas as culturas foram inoculadas (10% v/v) a partir da cultura de enriquecimento inicial 2 (EI - 10 mM H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) aos 56 dias de incubação, período no qual a cultura já havia atingido o pico de produção de metano. Dessa forma, é justificada a presença de arqueias pertencentes ao filo *Euryarchaeota*, uma vez que a cultura anterior estava produzindo metano.

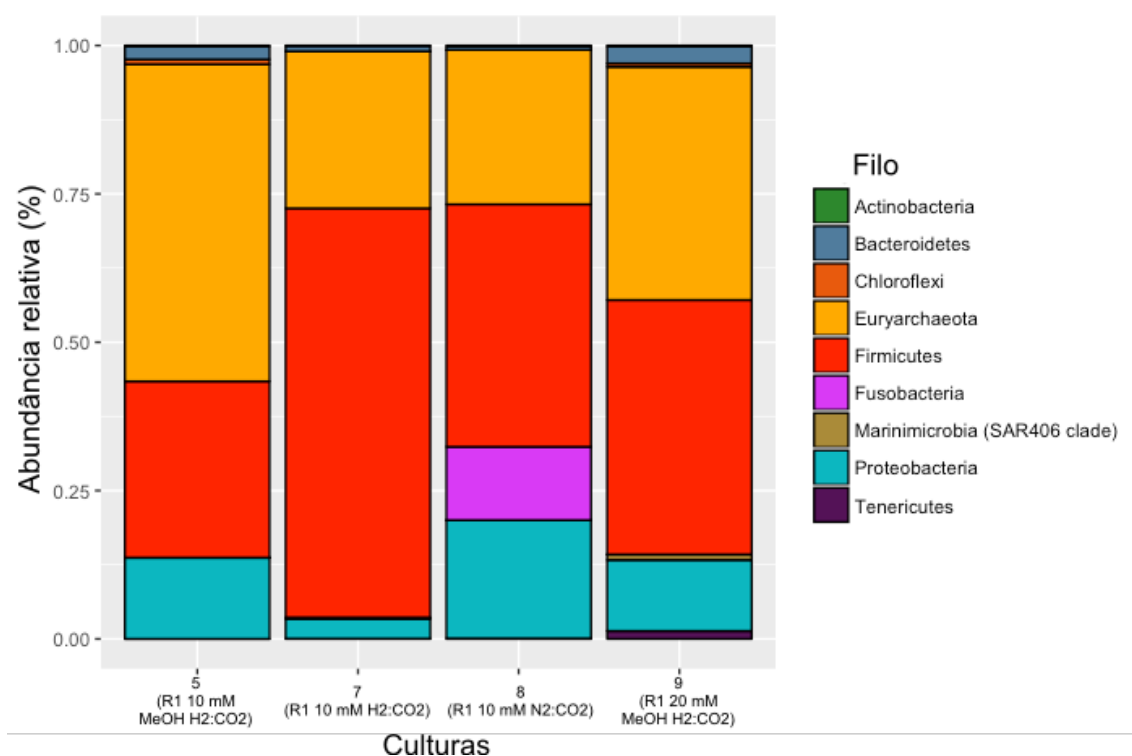
No tempo zero de incubação das culturas 7 e 8 eram observadas tanto bactérias quanto arqueias, mas aos 201 dias de incubação, período no qual havia

metano na atmosfera, é possível observar a presença apenas de arqueias (99,9% e 100%), demonstrando que houve variação na composição da comunidade ao longo da incubação.

As culturas contendo apenas metanol como fonte de substrato, a nível de filo, apresentaram resultado semelhante ao observado nas culturas 7 e 8 no tempo zero de incubação. O filo *Euryarchaeota* representava 53,2% e 39,0% da abundância relativa nas culturas 5 e 9, respectivamente, seguido pelo filo *Firmicutes* (30% e 43%), *Proteobacteria* (13,7% e 12,0%) e *Bacteroidetes* (2,2% e 2,8%).

O filo *Tenericutes* foi observado apenas na cultura 9 (1,3%) e organismos pertencentes a este filo não apresentam parede celular e não são capazes de sintetizar peptidoglicano (BROWN, 2015). O filo apresenta apenas uma classe, *Mollicutes*, que podem ser parasitas ou comensais de animais e plantas (RAZIN, YOGY e NAOT, 1998). Um candidato do gênero *Iziplasma*, pertencente ao filo *Tenericutes*, foi obtido através de cultivo de enriquecimento a partir de amostras de sedimento de seeps de metano. Apesar de ter sido isolado a partir de sedimento contendo metano, a reconstrução metabólica e os resultados do enriquecimento indicam que o gênero *Iziplasma* não atua no ciclo do metano ou enxofre, entretanto, fermentam produtos da degradação da matéria orgânica para produzir lactato e outros compostos como etanol e acetato que podem ser utilizados por arqueias metanogênicas (SKENNERTON et al., 2016).

**Figura 32.** Abundância relativa dos filos de bactéria e arqueia presentes nas culturas 5, 7, 8 e 9.



Por outro lado, a nível de gênero, as culturas apresentavam diferentes composições, sendo que as culturas 7 e 8 foram mais similares entre si, assim como as culturas 5 e 9. Nas culturas 7 e 8 os gêneros mais abundantes foram: *Sedimentibacter* (30,7% e 14,1%), *Methanococcoides* (26% em ambas), *Dethiosulfatibacter* (13,8% e 7,8%). Além dos gêneros de bactéria não cultivados (10,1% e 8,9%) ou não classificados (Figura 33).

Membros do gênero *Sedimentibacter* são estritamente anaeróbios, podem ser gram-negativos ou gram-positivos, células com formato de bacilos levemente curvos que podem ocorrer sozinhas ou em cadeias. São fermentadores e para o crescimento das células é necessário extrato de levedura (LECHNER, 2015).

Imachi et al. (2016) isolaram uma nova espécie através de culturas de enriquecimento de metanogênicas inoculadas a partir de sedimento marinho. Na presença de extrato de levedura o organismo era capaz de utilizar os aminoácidos leucina, metionina, glicina, lisina, arginina e entre outros. E extrato de levedura também pode ser uma fonte de energia para estes organismos. A presença de *Sedimentibacter* em todas as culturas pode ser justificada pela presença de extrato

de levedura na composição do meio. Além disso, trabalhos anteriores relataram que membros do gênero *Sedimentibacter* podem ser encontrados em culturas de enriquecimento de arqueias metanogênicas.

Organismos pertencentes ao gênero *Dethiosulfatibacter* são estritamente anaeróbios, as células são gram-negativas, apresentam forma de bacilos que podem ocorrer sozinhos, em pares ou em cadeias curtas. Alguns aceptores de elétrons são o tiosulfato e o enxofre elementar, mas não o sulfato, o sulfito e o nitrato. Alguns aminoácidos servem como substrato fermentativo, tais como piruvato, serina, cisteína, glutamato, casaminoácido, peptona, além de extrato de levedura, que também estimulou o crescimento (TAKII et al., 2007). Apesar da cisteína e extrato de levedura estarem presentes nas quatro culturas, o gênero só foi observado nas culturas que continham TMA, o que pode indicar que TMA ou algum produto de sua degradação possa ser utilizado por estes organismos.

Apesar de diferirem quanto aos gases presentes na atmosfera ( $H_2:CO_2$  na cultura 7 e  $N_2:CO_2$  na cultura 8), alguns gêneros foram observados exclusivamente em uma ou outra cultura. Na cultura 7 foram observados os gêneros *Clostridium sensu stricto* 1 (12,0%) e *Desulfobacterium* (2,7%) e na cultura 8 *Amphritea* (17,8%), *Psychrilyobacter* (12,2%), *Clostridium sensu stricto* 7 (4,8%) e *Brassicibacter* (2,7%).

As espécies do gênero *Clostridium* formam um grupo heterogêneo e não monofilético. Foi proposto que apenas o Cluster I (*Clostridium sensu stricto* 1) fosse reconhecido como gênero *Clostridium* verdadeiro, entretanto, esse cluster foi determinado apenas por questões filogenéticas, não levando em consideração características moleculares ou bioquímicas em comum (LAWSON et al., 1993; COLLINS et al., 1994). O cluster I compreende as espécies *C. acetobutylicum*, *C. novyi*, *C. kluyveri*, *C. beijerinckii*, *C. perfringes*, *C. botulinum* e *C. tetani* (GUPTA e GAO, 2009). Membros do gênero *Clostridium* são gram-positivos, anaeróbios, apresentam morfologia de bacilos e podem formar esporos. São encontrados em sedimento marinho antártico (GUAN et al., 2013) e podem utilizar diversas fontes de substratos para a fermentação, tais como carboidratos simples ou polissacarídeos como a lignocelulose (ATISTILDE, 2017; UJOR et al, 2015).

Não foi encontrada na literatura menção sobre o grupo "*Clostridium sensu stricto* 7", com exceção da classificação filogenética de Collins et al. (1994), que cita o Cluster 7, o qual compreende o gênero *Thermoanaerobacterium*. Membros desse

gênero são gram-negativos, apresentam morfologia de bacilos e podem formar longos filamentos (LEE et al., 1993). Algumas espécies podem utilizar glicose, frutose e extrato de levedura como substrato (HOSTER, DANIEL E GOTTSCHALK, 2001).

O gênero *Amphritea* foi isolado a partir de um mexilhão coletado em fonte hidrotermal (GÄRTNER, WIESE e IMHOFF, 2008), mas outros dois membros isolados de sedimentos marinhos (MIYAZAKI et al., 2008) são bacilos gram-negativos que apresentam flagelo. Podem crescer entre 4-40 °C e utilizam como fonte de carbono Tween 40, Tween 80, alanina, fenilalanina e entre outros, além de fermentarem glicose, manitol e arabinose.

Até o momento o gênero *Psychrilyobacter* apresenta apenas uma espécie descrita que foi isolada a partir de sedimento marinho do oceano Atlântico. São anaeróbios estritos, gram-negativos e possuem formato de bacilos. São capazes de utilizar como substrato glicose, frutose, citrato, glutamato, lisina, treonina, piruvato e fumarato, como produto da fermentação desses compostos produzem majoritariamente acetato e H<sub>2</sub> (ZHAO et al. 2009).

Organismos pertencentes ao gênero *Brassicibacter* são estritamente anaeróbios e são capazes de crescer em meios enriquecidos com casaminoácido, peptona, triptona e extrato de levedura, podem fermentar alguns tipos de açúcares e aminoácidos. As células são gram-negativas e apresentam formato de bacilo (FANG et al., 2012). A espécie *B. thermophilus* é potencialmente capaz de reduzir sulfato, tiosulfato e sulfito e foi isolada de sedimento marinho (WANG et al., 2015).

Nas culturas 5 e 9 o gênero *Methanococcoides* representou 53,2% e 38,8%, respectivamente das abundâncias relativas, seguido por bactérias não cultivadas (23% e 35,9%), *Desulfobacterium* (13,4% e 11,5%) e *Sedimentibacter* (6,2% em ambas).

Segundo Ticak et al. (2015) um dos isolados obtidos que pertencia ao gênero *Methanococcoides* era capaz de crescer em TMA e metanol, entretanto, foi observado que o crescimento em metanol era mais lento. Este comportamento também foi observado no presente trabalho nas culturas contendo apenas metanol como substrato (5 e 9), que só começaram a produzir metano após 54 dias de incubação, enquanto as culturas contendo TMA (3 e 7) produziram metano em seis dias de incubação.

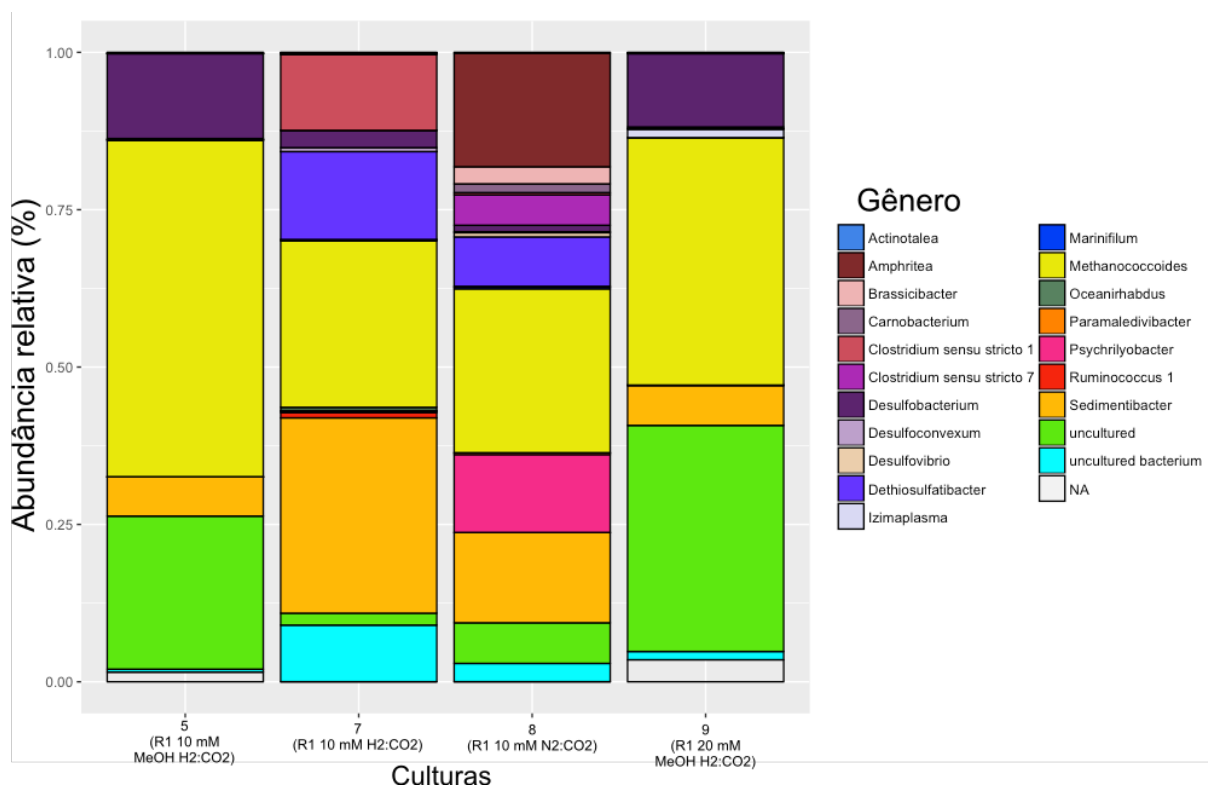
Membros do gênero *Desulfobacterium* são estritamente anaeróbios, podem realizar fermentação e são capazes de utilizar formiato, butirato, etanol, alguns aminoácidos e  $H_2:CO_2$  como fonte de carbono e doadores de elétrons. Sulfato, sulfito e tiosulfato podem ser utilizados como aceptores de elétrons. As células são gram-negativas e apresentam morfologia de bacilos, ovais ou células esféricas que podem ocorrer sozinhas, em pares ou cadeias (KUEVER, RAINEY e WIDDEL, 2015). A maior abundância de *Desulfobacterium* nas culturas 5, 7 e 9 provavelmente deve-se à presença de  $H_2:CO_2$  que pode ser utilizado por estes organismos. Como o metanol e TMA são substratos não competitivos entre metanogênicas e BRS, ambos os grupos foram capazes de crescer nas culturas.

O extrato de levedura é fonte de carboidratos, peptídeos, algumas vitaminas do complexo B, aminoácidos e também pode ser fonte de sulfato. Dentre os aminoácidos estão presentes a alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, triptofano e tirosina e valina (BD Bionutrients™ - Technical Manual, BD Biosciences). A presença de diversos grupos microbianos nas culturas pode estar relacionada com o extrato de levedura.

Em relação às morfologias observadas nas culturas do repique 1 (R1) as morfologias fluorescentes predominantes foram os cocos, sendo esta uma indicação de que as células metanogênicas apresentaram formas cocoides, enquanto a diversidade de bacilos observada foi possivelmente de células bacterianas.



**Figura 33.** Abundância relativa de gêneros de bactérias e arqueias presentes nas culturas 5, 7, 8 e 9.



#### 5.4 Aplicação da técnica de roll-tube para obtenção de colônias (culturas 1, 2 e 9)

Para a aplicação da técnica de isolamento de roll-tube, foram escolhidas culturas que estavam produzindo metano, na tentativa de se obter isolados de arqueias metanogênicas. As culturas 1, 2 e 9 além de estarem produzindo metano, foram escolhidas para avaliar se as diferentes concentrações e combinações de substratos selecionavam isolados diferentes.

O primeiro inóculo realizado foi da cultura 1, a partir de três diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$ ). Apenas nas diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  foram observadas formações de colônias. A diluição  $10^{-2}$  apresentou um grande número de colônias que muitas vezes estavam sobrepostas ou muito próximas umas das outras, desse modo, buscou-se escolher um maior número colônias com morfologias distintas para inóculo (Tabela 4). Através de microscopia foi observada uma grande diversidade de morfologias distintas, incluindo algumas morfologias fluorescentes (Figura 34).

As culturas de roll-tubes também foram acompanhados quanto à produção de metano, entretanto, nenhuma cultura produziu metano no período observado, apesar de observada diminuição na concentração de hidrogênio na atmosfera dos tubos.

**Tabela 5.** Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição  $10^{-2}$  da cultura 1 e as morfologias observadas na microscopia.

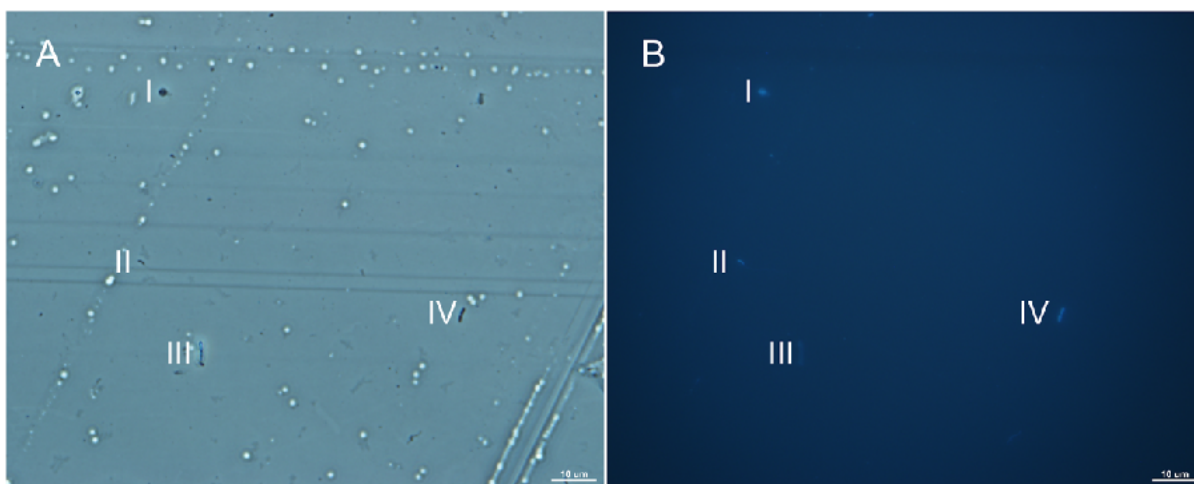
Colônia	Descrição morfológica da colônia	Descrição morfológica das células
Colônia 1	Grande, circular, elevada lisa, transparente e gelatinosa	Cocos escuros, bacilos imóveis, bacilos móveis e cocos irregulares
Colônia 2	Grande, circular, elevada lisa, transparente e gelatinosa	Bacilos escuros imóveis e diplobacilos
Colônia 3	Grande, circular, lisa, branca e leitosa	Bacilos escuros, bacilo com flagelo e cocos
Colônia 4	Grande, circular, elevada, lisa, transparente em volta e ponto branco no centro	Bacilo com flagelo, bacilo, cocos, estreptobacilo e coco com flagelo
Colônia 5	Média, oval, lisa e branca	Bacilos escuros, diplobacilos e cadeia de cocos
Colônia 6	Pequena, oval, lisa e castanha	Bacilos escuros, diplobacilos, cocos pequeno e bacilo com espaço
Colônia 7	Circular, lisa, branca e leitosa	Cocos e bacilos escuros
Colônia 8	Circular, elevada, lisa, transparente e gelatinosa	Bacilos, diplobacilos e cocos
Colônia 9	Grande, circular, elevada, lisa, transparente em volta e ponto branco no centro	Bacilos e cocos
Colônia 10	Grande, circular, elevada, lisa, transparente em volta e ponto branco no centro	Bacilos e cocos
Colônia 11	Pequena, irregular e preta	Bacilos e diplobacilos
Colônia 12	Média, circular, elevada, lisa, transparente em volta e ponto branco no centro	Bacilos e cocos
Colônia 13	Pequena, irregular, lisa e castanha	Bacilos, diplobacilos, cocos e diplococos

Continua na próxima página

## Continuação

Colônia	Descrição morfológica da colônia	Descrição morfológica das células
Colônia 14	Pequena, circular, lisa e castanha	Bacilos pequenos móveis, estreptobacilos, cocos móveis e bacilos imóveis
Colônia 15	Pequena, circular, ponto castanho no centro	Bacilos escuros
Colônia 16	Grande, circular, lisa, branca e leitosa	Bacilos escuros
Colônia 17	Pequena, oval, lisa e branca	Bacilos finos, diplobacilos e bacilos escuros

**Figura 34.** Morfologias presentes na cultura da colônia 1 da diluição  $10^{-2}$  da cultura 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 129 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Célula esférica translúcida; (II) Bacilo com flagelo; (III) Bacilo e (IV) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Célula esférica translúcida; (II) Bacilo com flagelo; (III) Bacilo e (IV) Diplobacilo; fluorescendo sob UV.

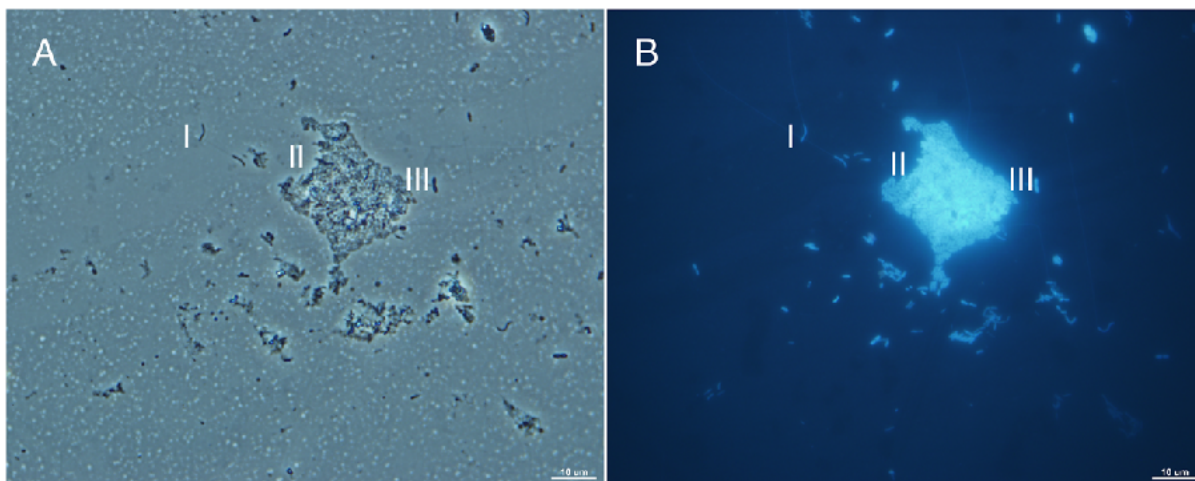


As colônias da diluição  $10^{-4}$  (Tabela 6) levaram um tempo mais longo para crescer e foram observadas apenas nove colônias, sendo oito delas bem similares. Não foi observada produção de metano no roll-tube ou nos inóculos das colônias, entretanto, era observada grande diversidade de morfologias fluorescentes (Figura 35) e por esta razão foram escolhidas as culturas das colônias de 1 a 5 desta diluição para extração e sequenciamento de DNA.

**Tabela 6.** Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição  $10^{-4}$  da cultura 1.

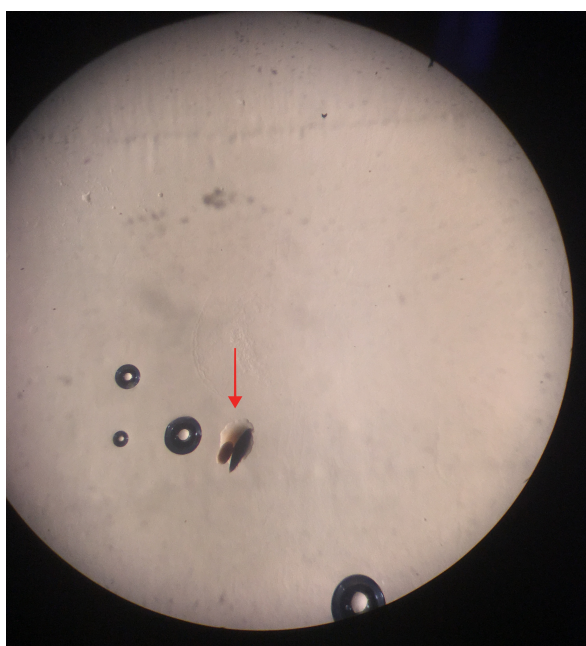
Colônia	Descrição morfológica da colônia	Descrição morfológica da microscopia
Colônia 1	Pequena, irregular, lisa e preta	Bacilos imóveis sozinhos ou agregados, microcolônia bacilos com flagelo, bacilos grossos e diplobacilos
Colônia 2	Média, circular, lisa castanho com halo branco em volta	Bacilos imóveis, diplobacilos, bacilos pequenos agregados, bacilos móveis, bacilos com flagelos e bacilos com “espaço”
Colônia 3	Média, circular, lisa castanho com halo branco em volta	Bacilos imóveis, bacilos com flagelo, bacilos finos, bacilos com espaços, diplobacilos e estreptobacilos
Colônia 4	Média, circular, lisa castanho com halo branco em volta	Bacilos escuros, diplobacilos, bacilos com “espaço” e diplococos
Colônia 5	Média, circular, lisa castanho com halo branco grande em volta	Bacilos com flagelo, bacilos móveis, célula esférica translúcida, cocos irregulares, bacilos com “espaço”, diplobacilos e bacilos pequenos em agregados
Colônia 6	Média, circular, lisa castanho com halo branco em volta	Bacilos imóveis, bacilos com espaços, diplobacilos, bacilos com flagelo e cocos
Colônia 7	Média, circular, lisa castanho com halo branco em volta	Cocos irregulares e bacilos móveis
Colônia 8	Média, circular, lisa castanho com halo branco em volta	Bacilos imóveis e móveis e bacilos com espaços e bacilos pequenos em agregados e cocos irregulares
Colônia 9	Média, circular, lisa castanho com halo branco em volta	Bacilos pequenos móveis e imóveis, cocos pequenos e bacilos com flagelos

**Figura 35.** Morfologias presentes na cultura da colônia 1 da diluição  $10^{-4}$  da cultura 1 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 77 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo com flagelo; (II) Bacilos agregados e (III) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo com flagelo; (II) Bacilos agregados e (III) Diplobacilo; fluorescendo sob UV.



Foi observado durante as análises microscópicas que as colônias selecionadas do roll-tube da cultura 1 não estavam isoladas e ao olhar em lupa com aumento de 20X foi possível observar que diversas colônias estavam sobrepostas (Figura 36) ou muito próximas uma das outras, dessa forma, a fim de obter isolados, buscou-se selecionar apenas colônias isoladas das diluições  $10^{-4}$  dos roll-tubes das culturas 2 e 9 através de visualização pela lupa (Figuras 37 e 39, respectivamente).

**Figura 36.** Exemplo de colônias sobrepostas (seta) observadas na diluição  $10^{-4}$  da cultura 9 observadas na lupa. Aumento 20X.

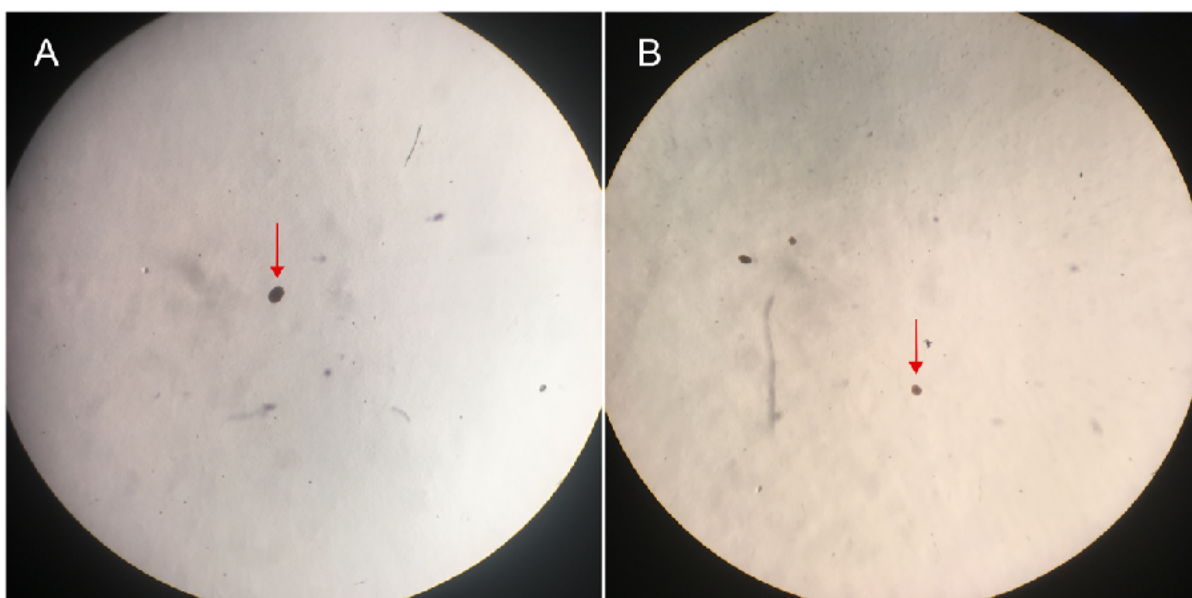


As colônias selecionadas das culturas 2 e 9 também foram descritas morfológicamente (Tabelas 7 e 8) e através de microscopia foi observada uma menor diversidade de morfologias quando comparada com as colônias das culturas 1 e 2 (Figuras 38 e 40).

**Tabela 7.** Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição  $10^{-4}$  da cultura 2.

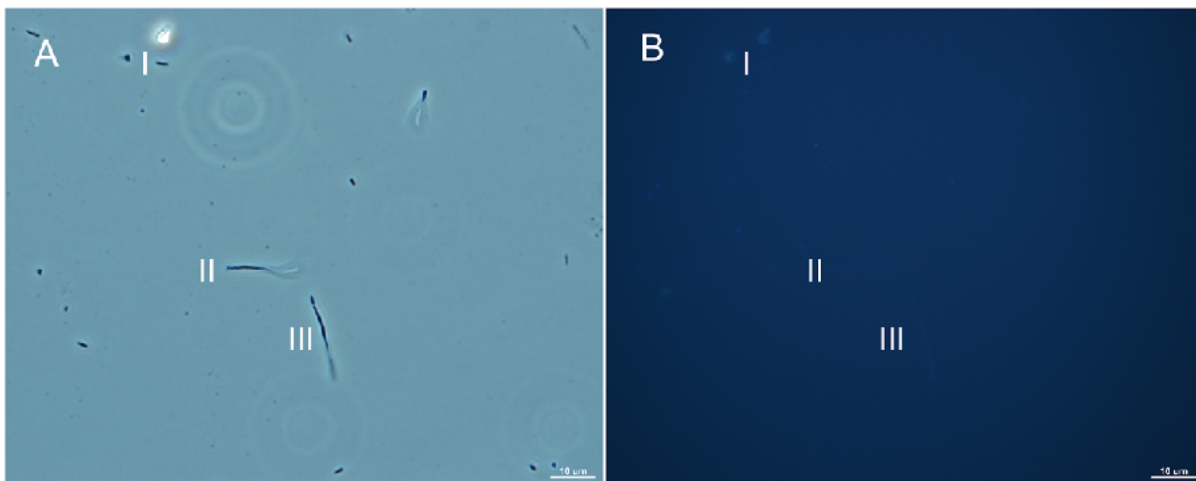
Colônia	Descrição morfológica da colônia	Descrição morfológica da microscopia
Colônia 1	Pequena, oval, lisa e marrom	Bacilos, estreptobacilos, bacilos compridos e diplobacilos
Colônia 2	Pequena, circular, lisa e castanha	Bacilos, diplobacilos e bacilos compridos

**Figura 37.** Colônias da diluição  $10^{-4}$  da cultura 2 observadas na lupa. Aumento 20X. (A) Colônia 1 e (B) Colônia 2.





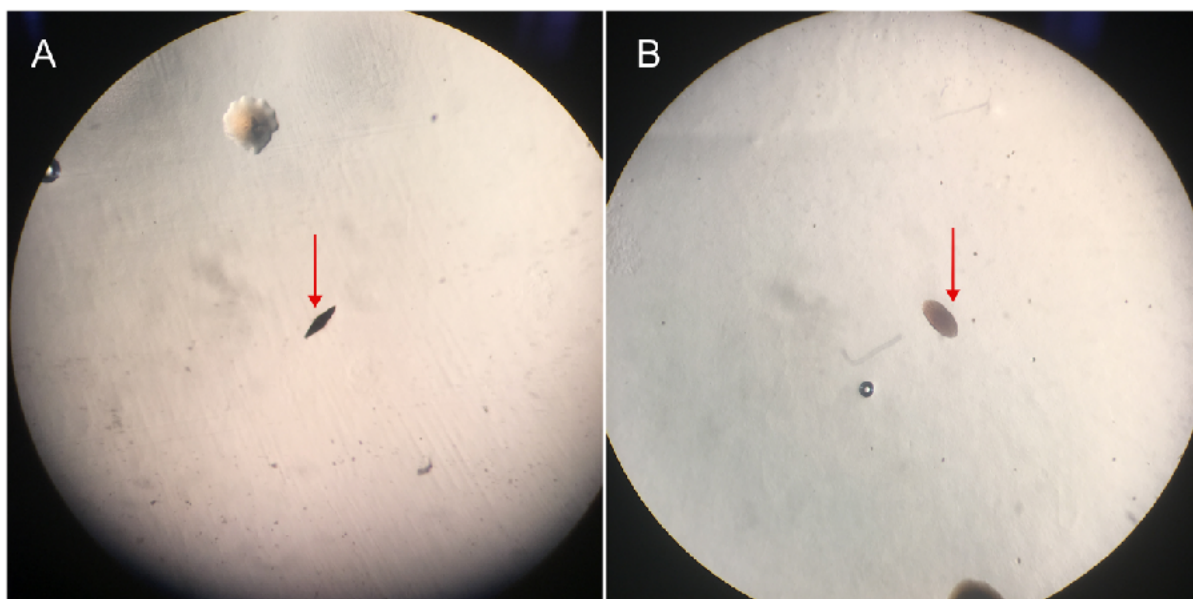
**Figura 38.** Morfologias presentes na cultura da colônia 1 da diluição  $10^{-4}$  da cultura 2 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 66 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo pequeno; (II) Bacilo comprido e (III) Estreptobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo pequeno; (II) Bacilo comprido e (III) Estreptobacilo; sob contraste de fase; fluorescendo sob UV.



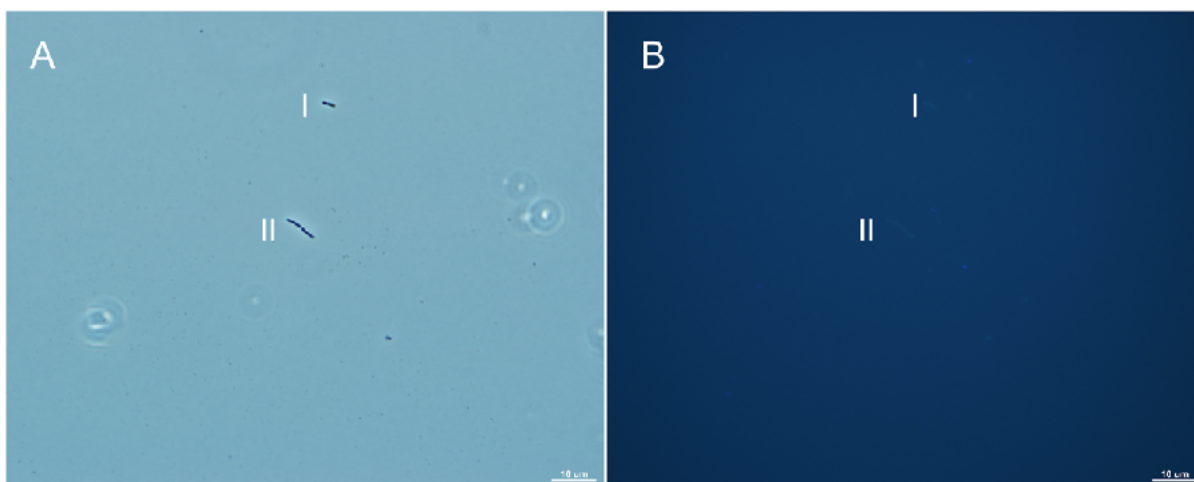
**Tabela 8.** Caracterização morfológica das colônias que cresceram na diluição  $10^{-4}$  da cultura 9.

Colônia	Descrição morfológica da colônia	Descrição morfológica da microscopia
Colônia 1	Pequena, oval, lisa e marrom escuro	Bacilos e cadeia de bacilos
Colônia 2	Pequena, oval, ornamentada e marrom clara	Bacilos, cocos e estreptobacilos

**Figura 39.** Colônias da diluição  $10^{-4}$  da cultura 9 observadas na lupa. Aumento 20X. (A) Colônia 1 e (B) Colônia 2.



**Figura 40.** Morfologias presentes na cultura da colônia 2 da diluição  $10^{-4}$  da cultura 9 (20 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 66 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) e (II) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) e (II) Diplobacilo ; sob contraste de fase; fluorescendo sob UV.



#### 5.4.1 Análise de sequenciamento das colônias do Roll-tube

As colônias de 1 a 5 da diluição  $10^{-4}$  da cultura 1 (EI - 10 mM  $H_2:CO_2$ ) foram escolhidas para sequenciamento de DNA pois apresentavam maior diversidade de morfologias, incluindo morfologias fluorescentes. As culturas estavam incubadas há 87 dias, mas não havia produção de metano.

Foram encontradas 186.101 sequências que foram classificadas em 457 OTUs. As colônias 2, 3, 4 e 5 apresentaram composições de comunidade semelhantes, enquanto na colônia 1 foi observada maior diversidade de filos e gêneros, da mesma forma que a diversidade de morfologias observadas na microscopia também era maior na colônia 1.

O Domínio *Bacteria* foi o mais abundante nas 5 colônias e dentro do domínio, o filo *Actinobacteria* foi o mais abundante nas colônias 2, 3, 4 e 5, representando 83%, 90,4%, 80,5% e 84,5% respectivamente, seguido do filo *Proteobacteria* (9,5%, 4,3%, 11,2% e 9,5%, respectivamente) (Figura 41).

Além do filo *Euryarchaeota*, o cofator  $F_{420}$  também é encontrado no filo *Actinobacteria* (GREENING et al., 2016) o que pode justificar a grande diversidade de morfologias fluorescentes presentes nas culturas das colônias da diluição  $10^{-4}$ .

Na colônia 1 o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante, representando 60,7% de abundância relativa, seguido por *Firmicutes* (10,7%). O filo *Patescibateria* (6,1%) foi observado apenas na colônia 1.

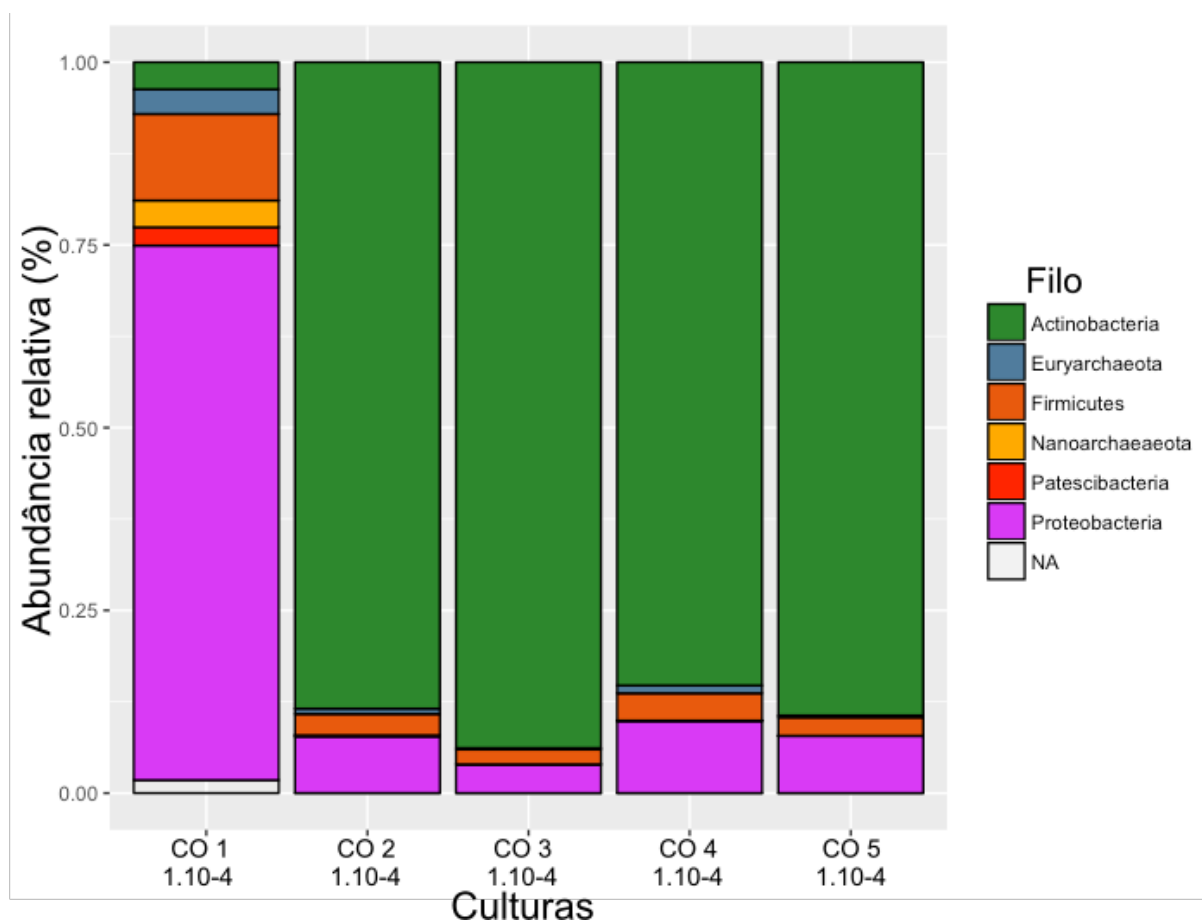


O superfilo *Patescibacteria* engloba os filos *Parcubacteria* (OD1), *Microgenomates* (OP11) e *Gracilibacteria* (GN02), o nome proposto faz referência à capacidade metabólica reduzida da linhagem (RINKE et al., 2013) o que possivelmente indica estilo de vida simbiote (WRIGHTON et al., 2012). Até o momento não existem representantes isolados, mas análises metagenômicas indicam que o superfilo tem ampla distribuição nos ecossistemas (SÁNCHEZ-OSUNA, BARBÉ e ERILL, 2017).

A maior abundância relativa de arqueias foi observada na colônia 1 sendo que cerca de 6,8% era referente ao filo *Nanoarchaeota* e 2,4% ao filo *Euryarchaeota*. A abundância relativa baixa do filo *Euryarchaeota* já era esperada visto que durante o período monitorado nenhuma das colônias produziu metano, apesar de apresentarem morfologias fluorescentes sob luz UV.

O filo *Nanoarchaeota* foi descrito em 2002 e inclui organismos simbiotes ou parasitas obrigatórios, tendo genoma reduzido e boa parte da capacidade biossintética associada ao seu hospedeiro. Apesar do único representante do filo ter sido isolado de sistema hidrotermal, há indícios sugerindo que o filo é amplamente distribuído em diferentes ecossistemas (CLINGENPEEL et al., 2013). Acredita-se que a única espécie isolada até o momento só consiga crescer na presença de *Ignicoccus hospitalis*, representante do filo *Crenarchaeota*. O representante do filo *Nanoarchaeota* cresce anaerobicamente em meio contendo enxofre elementar e  $H_2:CO_2$  (HUBER et al., 2003). Através das análises de sequenciamento não foram encontradas sequências referente ao filo *Crenarchaeota* nessas culturas.

**Figura 41.** Abundância relativa dos filos de bactérias e arqueias presentes nas culturas das colônias obtidas no roll-tube da cultura 1 da diluição  $10^{-4}$ .



Dentro do filo *Actinobacteria*, o gênero mais abundante nas colônias 2, 3, 4 e 5 (82%, 90%, 79,5% e 83,6%, respectivamente) era o *Actinotalea*. O gênero mais abundante na colônia 1 era *Rhodanobacter* (23%) e era o segundo mais abundante no restante das colônias (4,7%, 1,8%, 4,5 % e 3,5%) (Figura 42).

Organismos pertencentes ao gênero *Actinotalea* são gram-positivos, podem ser anaeróbios facultativos ou aeróbios, apresentam fisiologia e morfologias diversas. Geralmente crescem entre 15-35 °C e podem hidrolisar pectina, tween 80 e dextrina (ZHAO et al., 2014). A hidrólise da pectina pode gerar metanol que é utilizado como fonte de carbono por arqueias metanogênicas, além disso, Pessi et al. (2012) descreveram que a comunidade microbiana encontrada em amostras de solo nas proximidades da geleira Wanda são capazes de utilizar Tween 80, que é acumulado por algas como composto crioprotetor (SALA et al., 2008), como fonte de carbono.

Membros do gênero *Rhodanobacter* são gram-negativos, apresentam formato de bacilos e não formam esporos (NALIN et al., 1999), a maior parte de espécies descritas são aeróbias, mas Prakash et al. (2012) isolaram uma nova espécie que é anaeróbia facultativa e capaz de realizar desnitrificação, além de realizar hidrólise de gelatina e assimilar glicose, glicogênio, maltose e acetato de sódio.

Na colônia 1 foi observada uma grande diversidade de gêneros, mas os mais abundantes, depois de *Rhodanobacter*, foram gêneros de bactérias não cultivadas (10,0%), *Acinetobacter* (7,1%), *Pseudomonas* (5,2%), *Pseudoalteromonas* (4,1%), *Staphylococcus* (3,6%) e *Methanococcoides* (2,3%). Essa grande diversidade de gêneros é compatível com a maior diversidade de morfologias observadas na microscopia dessa colônia.

Alguns membros dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudoalteromonas* são capazes de degradar ágar (ROSELINE e SACHINDRA, 2016; JUNG et al., 2012), dessa forma, o inóculo no roll-tube (que consiste no meio acrescido de 2% de ágar) pode ter influenciado a seleção destes grupos. Ambos os gêneros apresentam como características células gram-negativas, morfologia de bacilos que podem ocorrer sozinhos ou em cadeias, além de serem estritamente aeróbios (JUNI, 2015; BOWMAN e MCMEEKIN, 2015), o que não corresponde às condições de cultivo.

Organismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram isolados de cultivos realizados a partir de amostras de sedimento e solo coletados na Península Fildes (Ilha Rei George). O isolamento de bactérias foi realizado em ágar contendo extrato de carne e peptona. Foram isoladas 443 colônias de diferentes morfologias e características, mas somente 70 foram escolhidas para análise molecular (PCR-DGGE). Ao serem analisadas em microscópio todas as amostras apresentavam maior abundância de bacilos e poucos cocos. Dos 70 isolados, 22 eram membros do gênero *Pseudomonas* (FAN et al., 2013), portanto, é um gênero comumente isolado a partir de sedimentos marinhos antárticos.

A trimetilamina mono-oxigenase (Tmm) é uma enzima importante e expressa em bactérias que crescem na presença de TMA, como os clados *Rosebacter* (MRC) e SAR11 (CHEN et al., 2011). Além disso, a espécie *Pseudomonas aminovorans* é capaz de converter TMA a TMAO pelo uso da Tmm e o TMAO é convertido a formaldeído que será utilizado como fonte de carbono. A amônia gerada nessa reação será assimilada como fonte de nitrogênio (CHANDLER, 1983; LARGE,

BOULTON e CRABBE, 1972). Em outras espécies do gênero *Pseudomonas* que não possuem esta enzima, a TMA é utilizada apenas como fonte de carbono (CHANDLER, 1983).

O gênero *Staphylococcus* é distribuído amplamente na natureza e ocupa diversos nichos (GÖTZ, BANNERMAN e SCHLEIFER, 2006). Apesar de serem um grupo majoritariamente encontrado em pele e mucosas de humanos, outros mamíferos e algumas aves, amostras ambientais podem conter uma pequena parcela de *Staphylococcus* que possivelmente ocorrem devido à contaminação por humanos, alguns mamíferos ou aves (EMMETT e KLOOS, 1975; 1979). São anaeróbios facultativos e gram-positivos. Recentemente, PANTUČEK et al. (2018) isolaram uma nova espécie a partir de fragmento de rochas e areia coletada na Ilha James Ross, Antártica, que é capaz de reduzir nitrato, hidrolisar Tween 80, usar L-alanina, L-arginina, L-ácido glutâmico, L-serina, pectina, Tween 40 e outros como fonte de carbono.

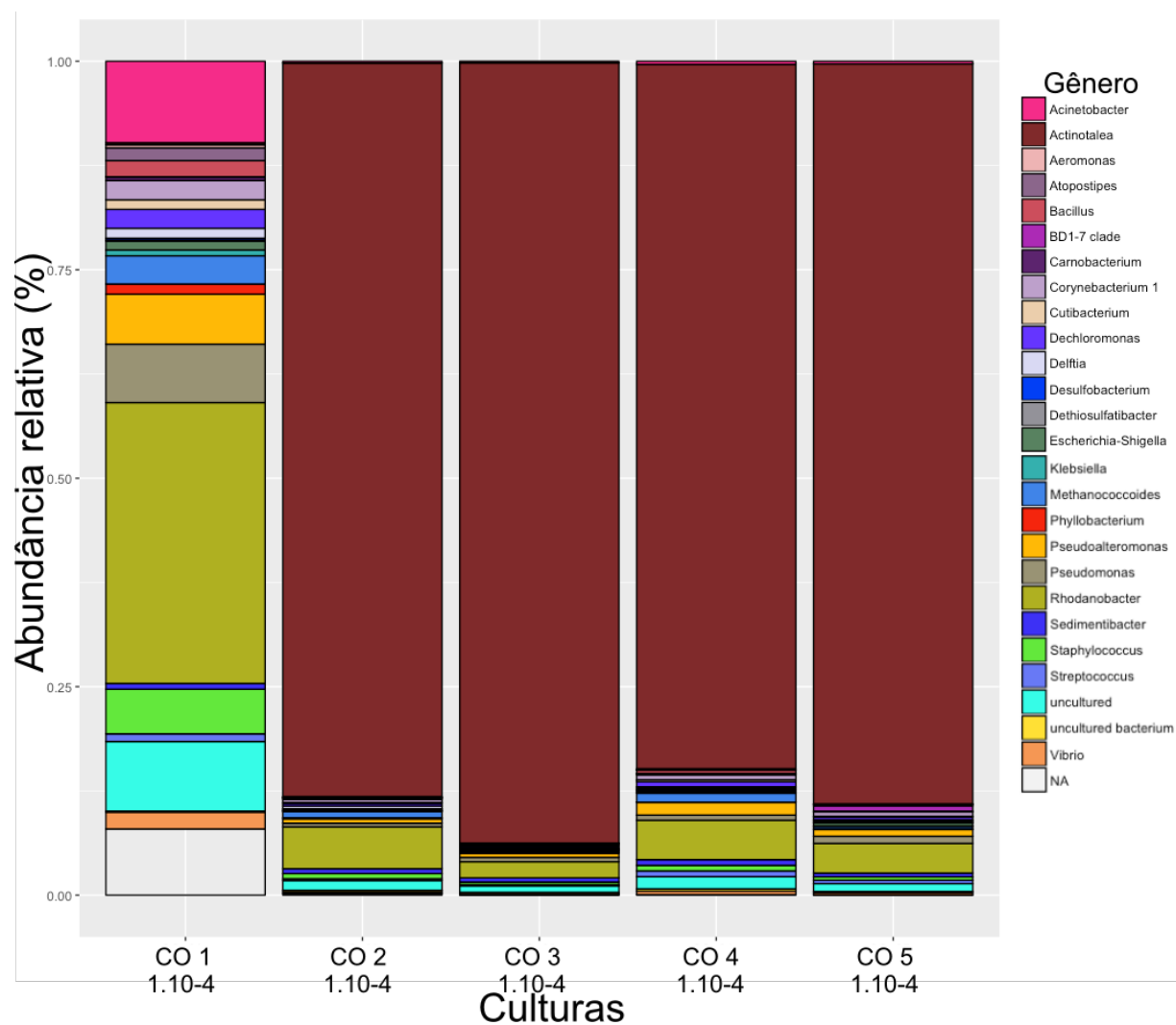
Foi observada uma grande quantidade de gêneros de bactérias que não foram anteriormente relatados, entretanto, a cultura que serviu de inóculo para o roll-tube foi a cultura 1 aos 636 dias de incubação e logo após início da produção de metano. Os dados obtidos de sequenciamento dessa cultura foram referentes aos 257 dias de incubação, não sendo possível afirmar se houve ou não alteração na composição da comunidade.

Por outro lado, é possível afirmar que as condições estabelecidas no roll-tube não foram eficientes para isolamento de arqueias metanogênicas. Um dos fatores pode ser a ausência de antibiótico com atuação sobre bactérias gram-negativas, visto que a maioria dos gêneros observado incluem organismos gram-negativos.

A morfologia das colônias 2, 3, 4 e 5 foi similar, assim como os grupos microbianos identificados no sequenciamento, indicando a ocorrência de alguns agrupamentos comuns e de difícil isolamento. Para as demais colônias, a seleção foi feita a partir da observação em lupa com aumento de 20X. Esse procedimento foi importante para constatar que as colônias na verdade não estavam isoladas, em alguns casos havia sobreposição de uma ou mais colônias (Figura 38) ou se encontravam muito próximas, não sendo possível distinguir esta característica a olho nu. Dessa forma, a grande diversidade de gêneros nas culturas dessas colônias indica que haviam colônias muito próximas ou sobrepostas. Esta forma de

crescimento também reflete possivelmente a natureza sintrófica das relações entre grupos microbianos.

**Figura 42.** Abundância relativa dos gêneros de bactérias e arqueias presentes nas culturas das colônias obtidas no roll-tube da cultura 1 da diluição  $10^{-4}$ .



## **5.5 Produção de metano e caracterização morfológica das culturas do repique 2 (R2)**

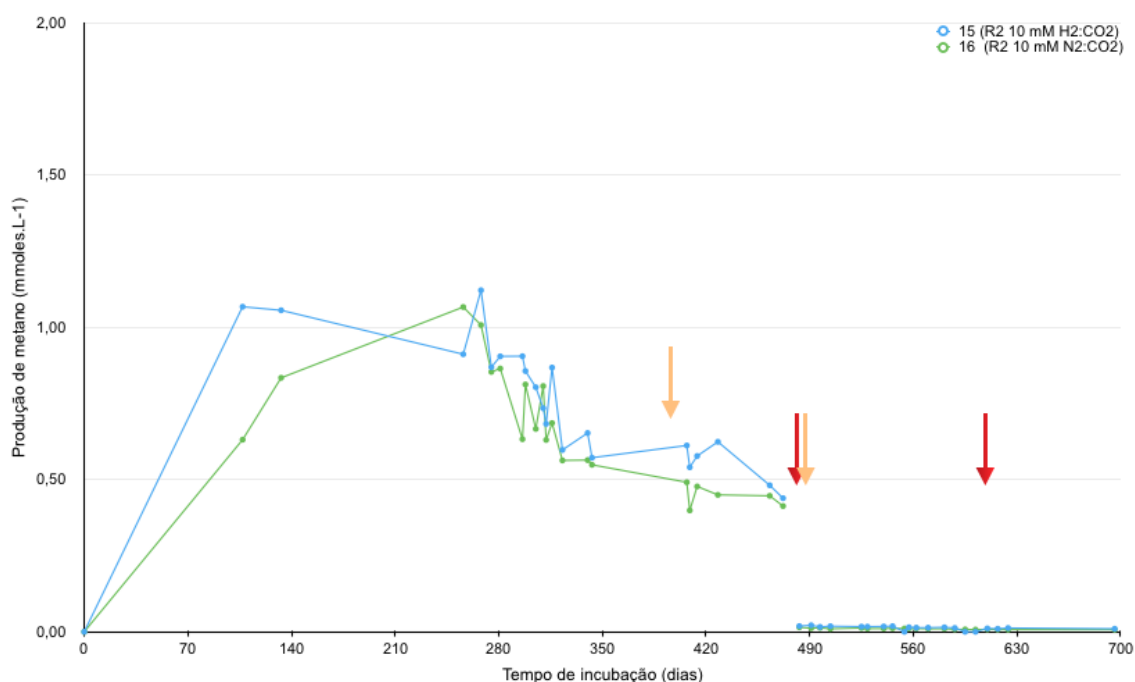
O segundo repique foi feito inicialmente apenas das culturas que estavam produzindo metano no R1 (culturas 3, 4, 5, 7 e 8), após 54 dias de incubação das culturas do R1, período no qual as culturas ainda não apresentavam queda na produção de metano. O repique das culturas contendo apenas metanol (5 e 9) foi feito após 279 dias de incubação e dos enriquecimento iniciais (6 e 10), após 329 dias.

### **5.5.1 Repiques alimentados com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ e $N_2:CO_2$ (culturas 15 e 16)**

Ao contrário das culturas do repique anterior (culturas 7 e 8), para as quais houve maior produção de metano sob atmosfera de hidrogênio, as culturas deste repique produziram aproximadamente a mesma quantidade de metano. A máxima produção de metano pela cultura 15 foi observada aos 268 dias de incubação, correspondendo a  $1,12 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  de metano (25,1%), enquanto a cultura 16 produziu  $1,07 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  de metano (23,9%) em 256 dias. Após realimentação e troca de atmosfera, nenhuma das culturas voltou a produzir metano e não houve alteração na concentração de hidrogênio presente na atmosfera da cultura 15 (Figura 43).

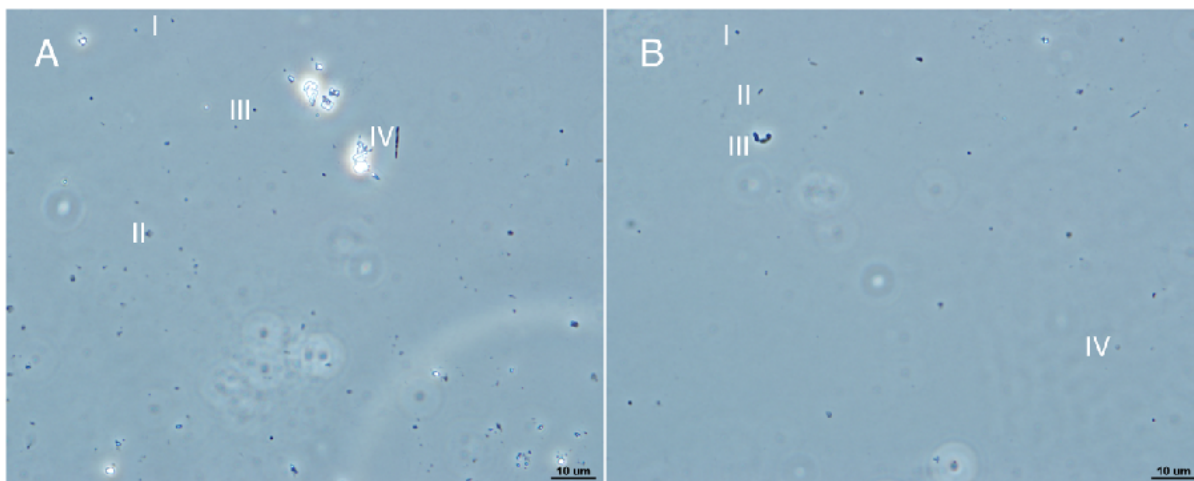
Em alguns pontos a produção de metano pela cultura 15, que continha hidrogênio na atmosfera, foi maior que na cultura 16, entretanto, no geral a diferença entre as duas foi menor quando comparada com as culturas 7 e 8.

**Figura 43.** Produção de metano pelas culturas 15 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $\text{H}_2:\text{CO}_2$ ) em azul e enriquecimento inicial 16 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $\text{N}_2:\text{CO}_2$ ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.

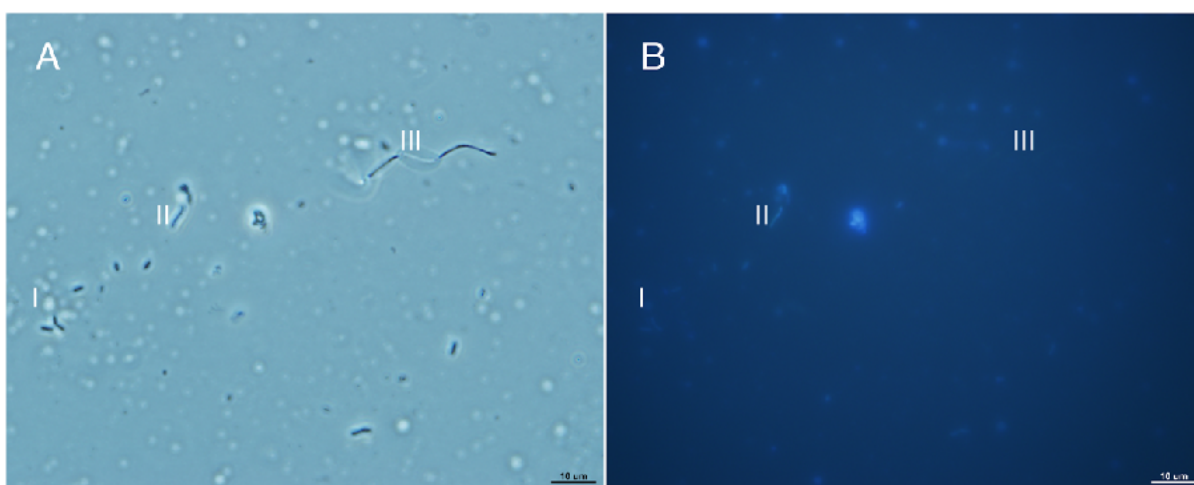


Aos 474 dias de incubação em ambas as culturas foram observados cocos escuros pequenos, bacilos finos e bacilos escuros (Figura 44). E apesar de não haver produção de metano após a realimentação, foram observadas algumas morfologias fluorescentes, principalmente bacilos (Figura 45).

**Figura 44.** Morfologias presentes na cultura 16 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 474 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro com flagelo; (II) Célula esférica translúcida; (III) Coco escuro e (IV) Bacilo fino. (B) (I) Coco escuro; (II) Bacilo pequeno. (III) Bacilos escuros e (IV) Célula esférica translúcida; sob contraste de fase.



**Figura 45.** Morfologias presentes na cultura 16 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 591 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I); (II) Bacilos escuros e (III) Bacilo em espiral sob contraste de fase. (B) (I); (II) Bacilos escuros e (III) Bacilo em espiral fluorescendo sob UV.



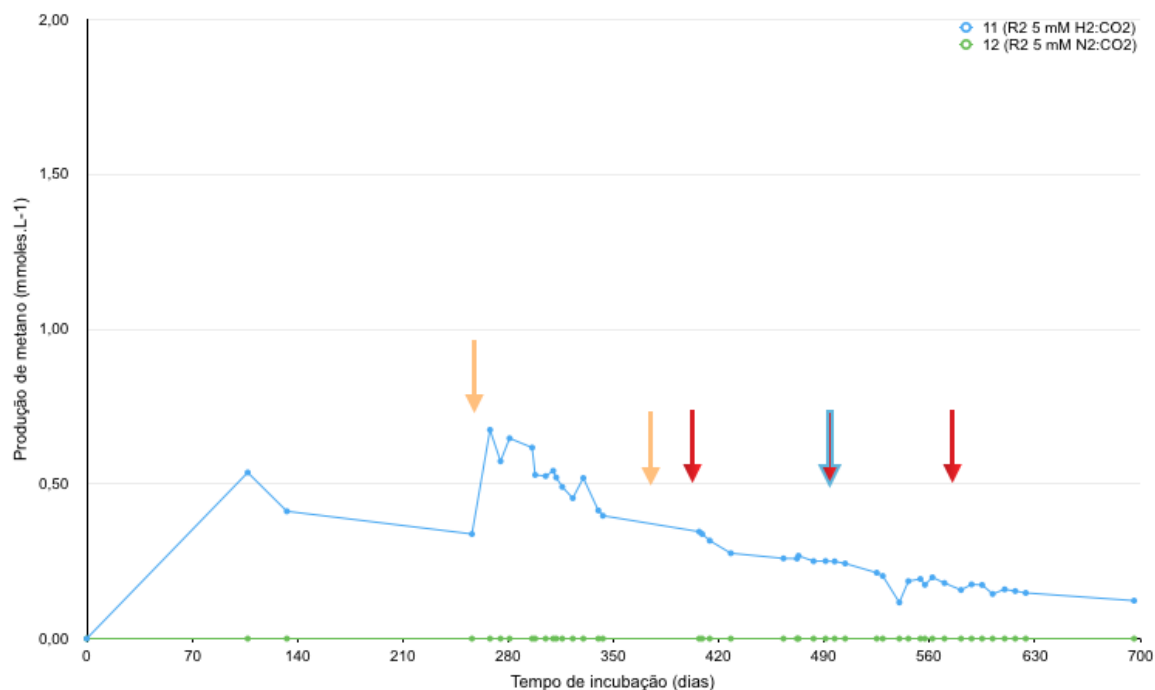
### 5.5.2 Repiques alimentados com 5 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ e $N_2:CO_2$ (culturas 11 e 12)

Neste segundo repique feito a partir das culturas 3 e 4, não foi observada produção de metano pela cultura 12, enquanto a cultura 11 produziu  $0,674 \text{ mmoles.L}^{-1}$  de metano (15,1%), valor bem inferior ao observado no repique anterior,



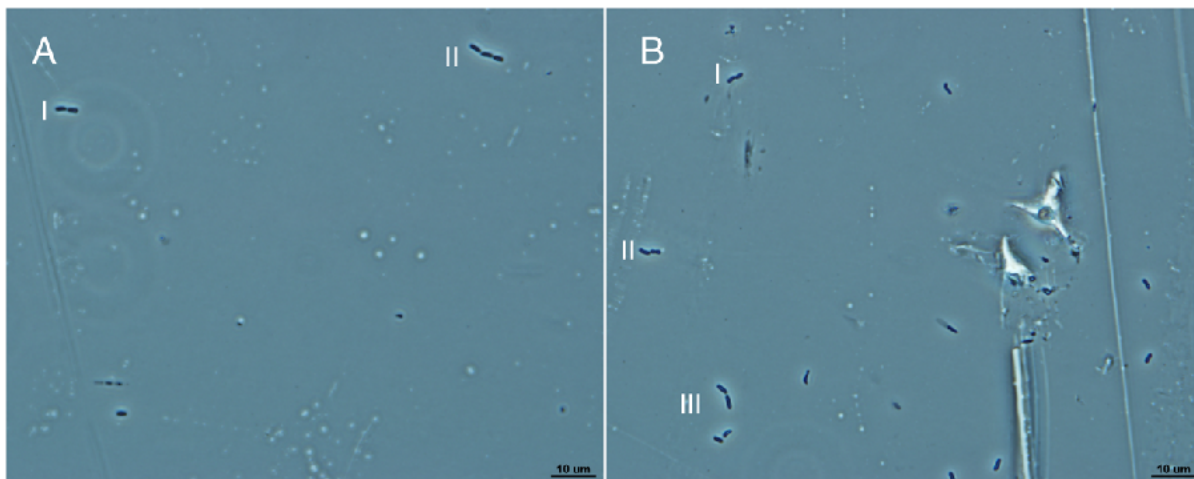
o que indica diminuição da comunidade de arqueias metanogênicas ou perda de condições favoráveis à metanogênese (Figura 46).

**Figura 46.** Produção de metano pelas culturas 11 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul e enriquecimento inicial 12 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) em verde. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas..

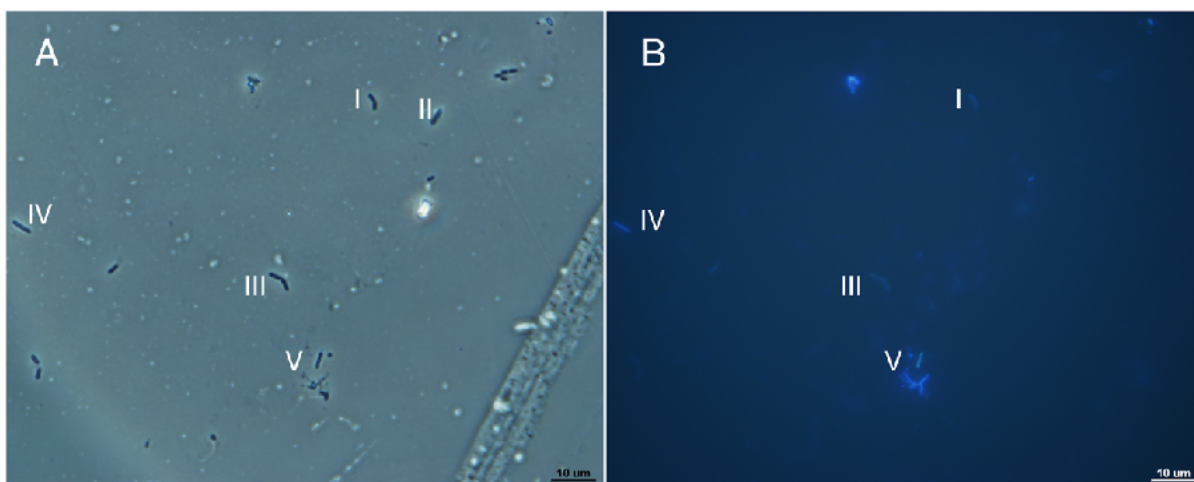


Ao contrário da cultura 3, na cultura 11 havia predomínio de bacilos (Figura 47) em ambos os períodos observados. Aos 584 dias de incubação é possível observar morfologias fluorescentes (Figura 48).

**Figura 47.** Morfologias presentes na cultura 11 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 504 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro e (II) Estreptobacilos escuros. (B) (I); (II) e (III) Bacilos escuros; sob contraste de fase.



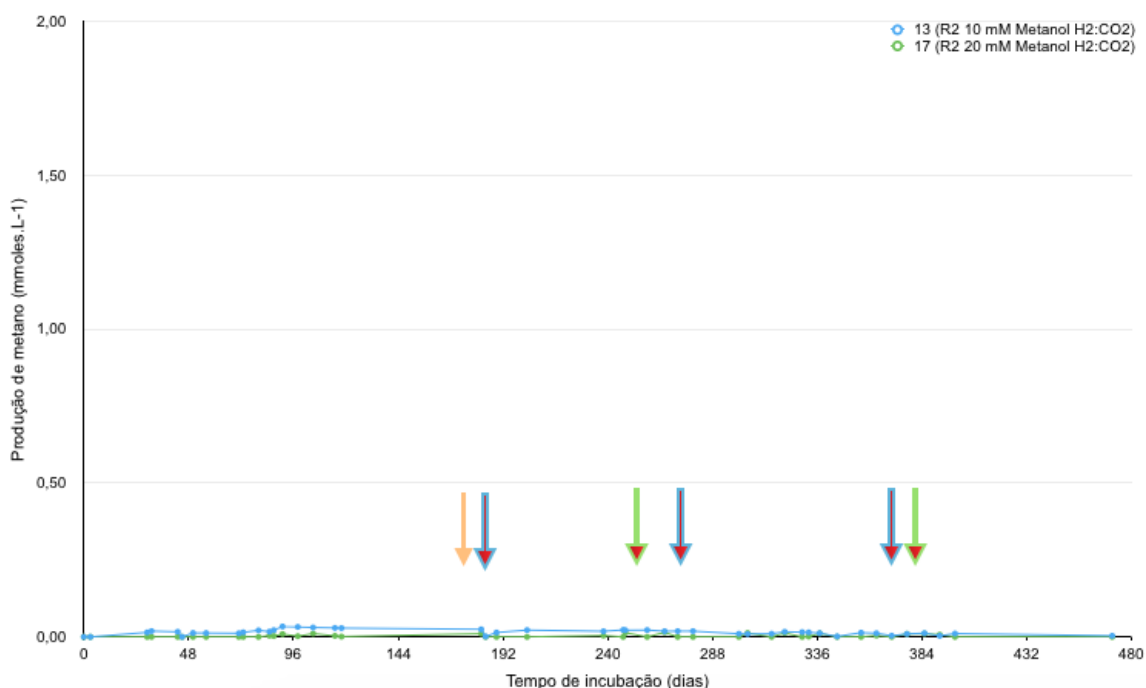
**Figura 48.** Morfologias presentes na cultura 11 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 584 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro; (II) Bacilo com grânulos; (III) Diplobacilo escuro; (IV) Bacilo reto e (V) Estreptococo; sob contraste de fase (B) (I) Diplobacilo escuro; (III) Diplobacilo escuro; (IV) Bacilo reto e (V) Estreptococo; fluorescendo sob UV.



### 5.5.3 Repiques alimentados com 10 mM e 20 mM de metanol, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ (culturas 13 e 17)

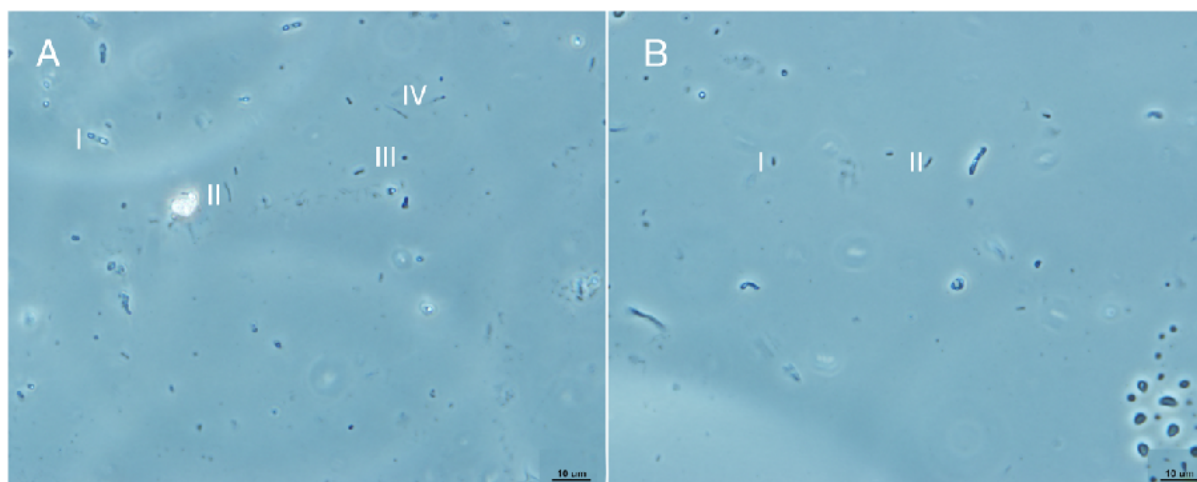
As culturas 13 e 17, repicadas a partir das culturas 5 e 9 não apresentaram produção de metano no período analisado (Figura 49).

**Figura 49.** Produção de metano pelas culturas 13 (10 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul e 17 (20 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia e as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.

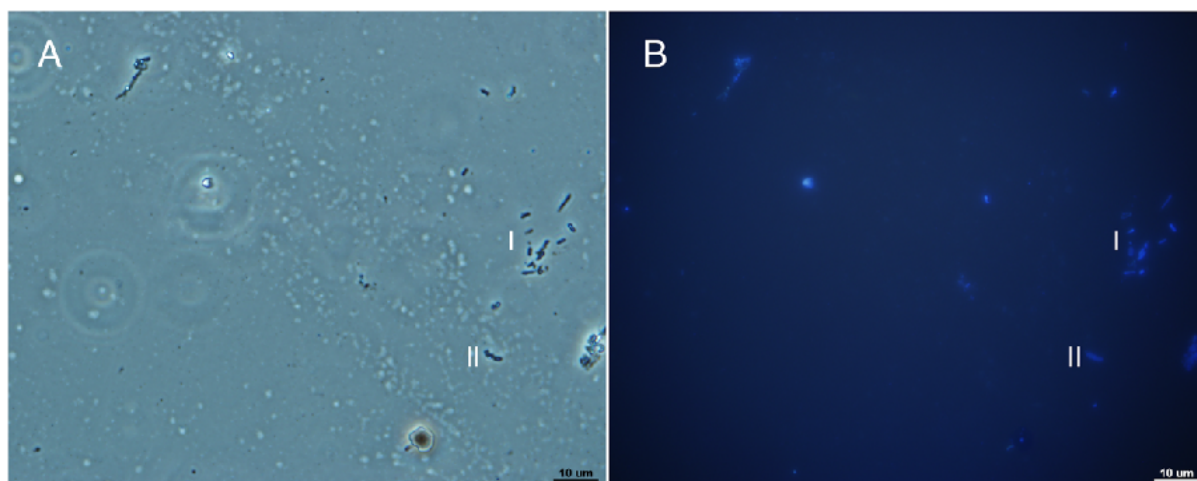


Apesar de não produzirem metano, ambas as culturas apresentaram grande diversidade de morfologias. Foram observados bacilos com “espaços” em diferentes posições (Figura 50), algumas morfologias fluorescentes (Figura 51) e, assim como o repique anterior, havia predomínio de bacilos (Figura 52).

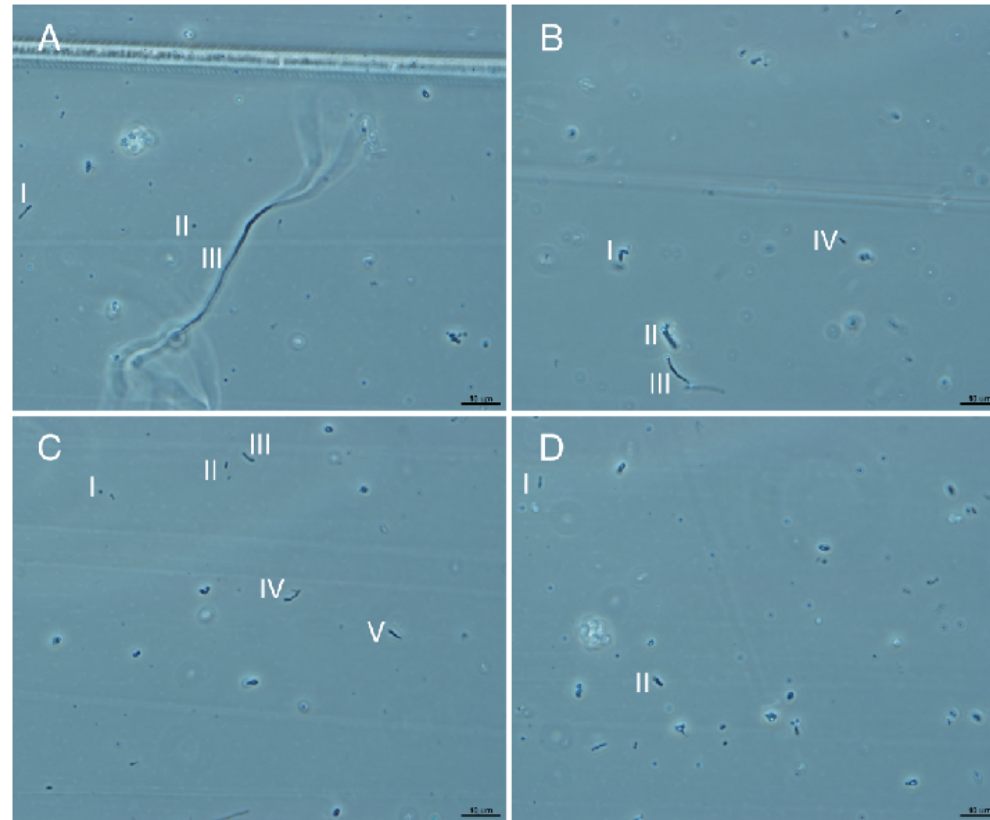
**Figura 50.** Morfologias presentes na cultura 13 (10 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 139 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo com “espaço”; (II) Bacilo fino; (III) Coco escuro e (IV) Bacilo com flagelo. (B) (I) e (II) Bacilos; sob contraste de fase.



**Figura 51.** Morfologias presentes na cultura 13 (10 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 279 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos escuros e (II) Diplobacilo; sob contraste de fase. (B) (I) Bacilos escuros e (II) Par de bacilo; fluorescendo sob UV.



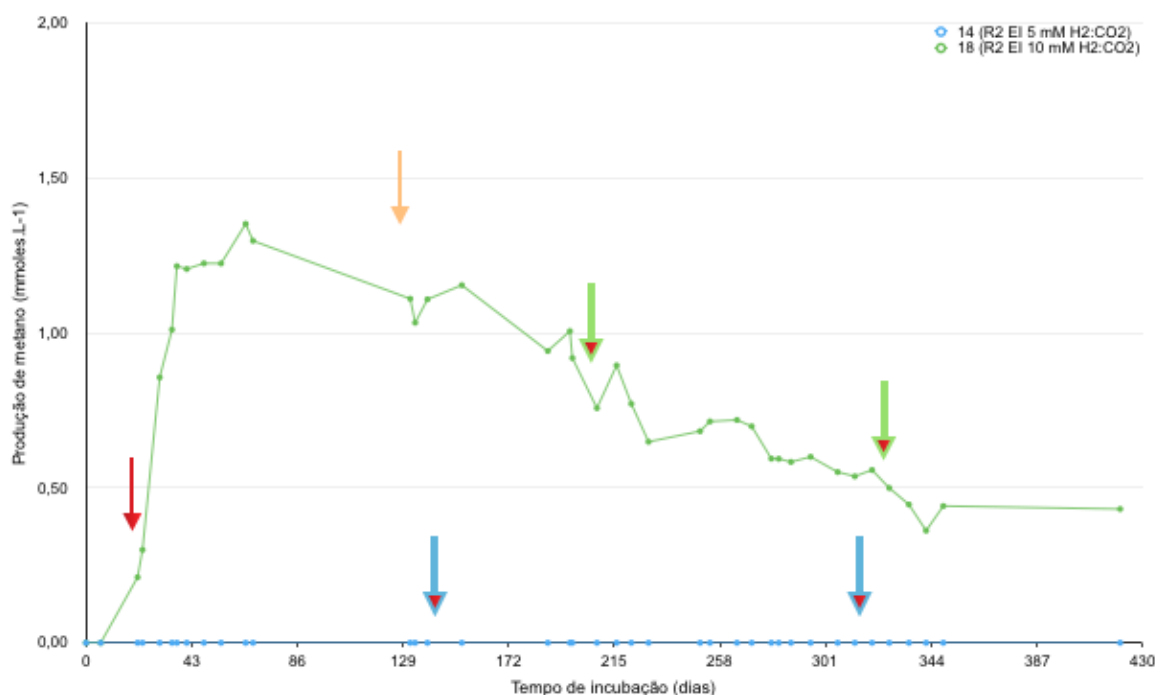
**Figura 52.** Morfologias presentes na cultura 17 (10 mM de metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos pequeno; (II) Coco escuro e (III) Bacilo comprido. (B) (I) Bacilo curvo com grânulos; (II) Bacilo escuro; (III) Bacilo com grânulos e (IV) Bacilo escuro. (C) (I) Coco escuro; (II) Bacilo pequeno. (III) Bacilo escuro; (IV) Estreptobacilo e (V) Bacilo escuro. (D) (I) Bacilo pequeno e (II) Bacilo com “espaço”; sob contraste de fase.



#### 5.5.4 Repiques alimentados com 5 mM e 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ (culturas 14 e 18)

O repique destas culturas foi feito aos 275 dias de incubação das culturas do R1 (culturas 6 e 10), período no qual ambas apresentaram metano na atmosfera. Entretanto, mesmo possivelmente havendo arqueias metanogênicas ativas no momento de inóculo, a cultura 14 não produziu metano. O pico de produção da cultura 18 de metano foi aos 65 dias de incubação, correspondendo a 1,35 mmoles.L<sup>-1</sup> de metano (30,3%) (Figura 53).

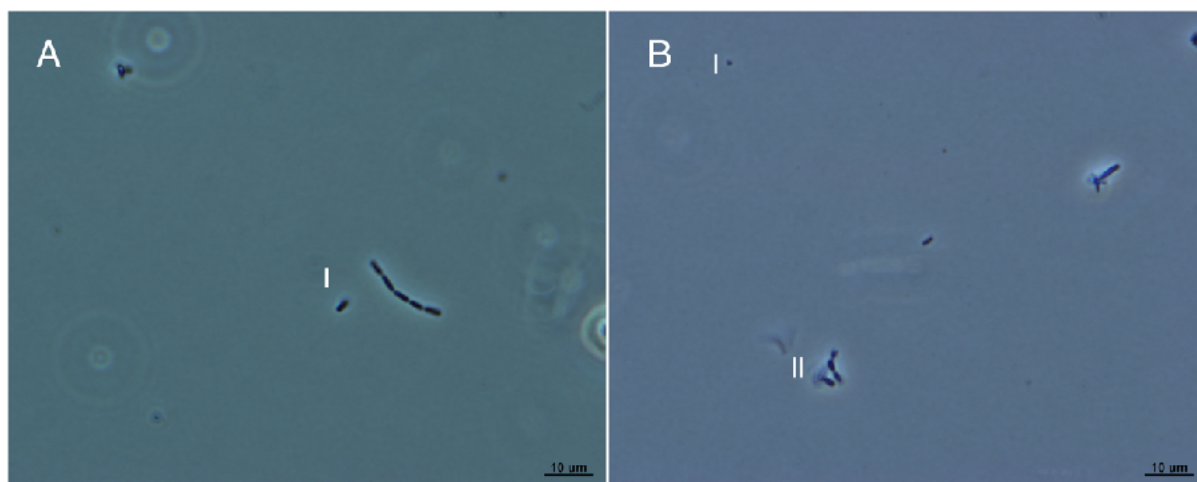
**Figura 53.** Produção de metano pelas culturas 14 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul e 18 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em verde. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia e as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.



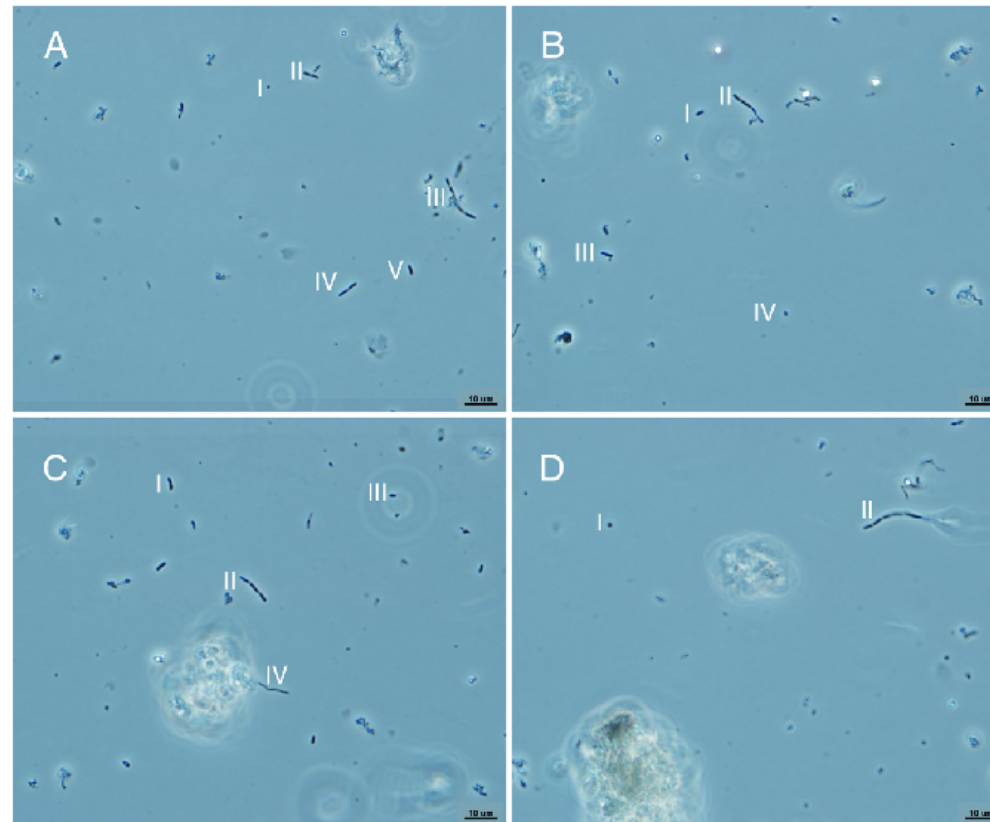
A cultura 14 apresentou basicamente as mesmas morfologias em ambos períodos de observação, havendo predomínio de estreptobacilos escuros (Figura 54) e bacilos de diferentes tamanhos (Figura 55).



**Figura 54.** Morfologias presentes na cultura 14 (5 mM trimetilamina e 5 mM metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) aos 23 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo escuro. (B) (I) Coco escuro e (II) Diplobacilo escuro; sob contraste de fase.



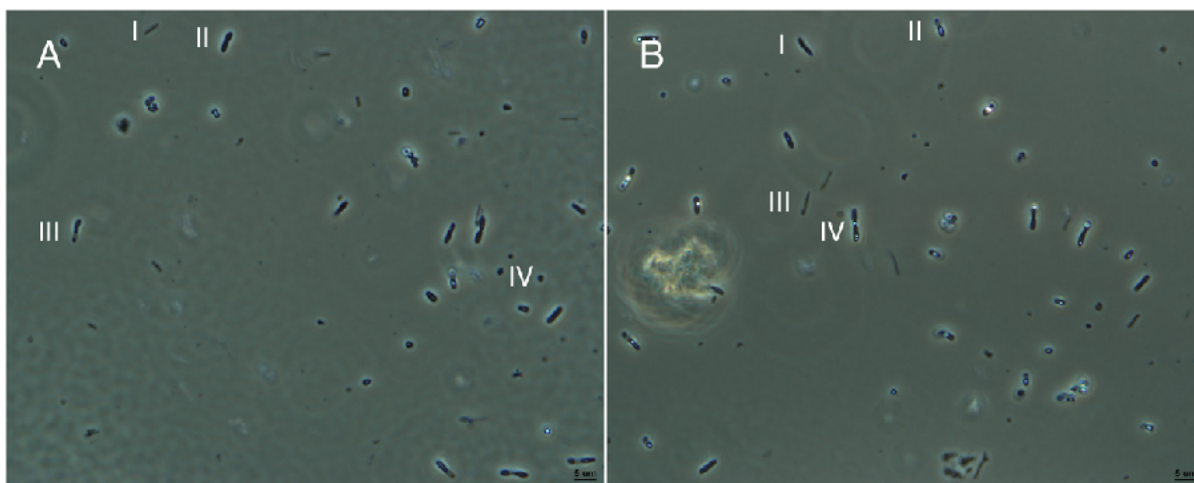
**Figura 55.** Morfologias presentes na cultura 14 (10 mM trimetilamina e 10 mM metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) aos 139 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro; (II) Diplobacilo escuro; (III) Estreptobacilo escuro; (IV) Diplobacilo escuro e (V) Bacilo escuro. (B) (I) Bacilo escuro; (II) Estreptobacilo escuro e (IV) Coco. (C) (I) Diplobacilo; (II) Estreptobacilo escuro; (III) Bacilo escuro e (IV) Bacilo fino com grânulos. (D) (I) Coco escuro e (II) Estreptobacilo escuro; sob contraste de fase.



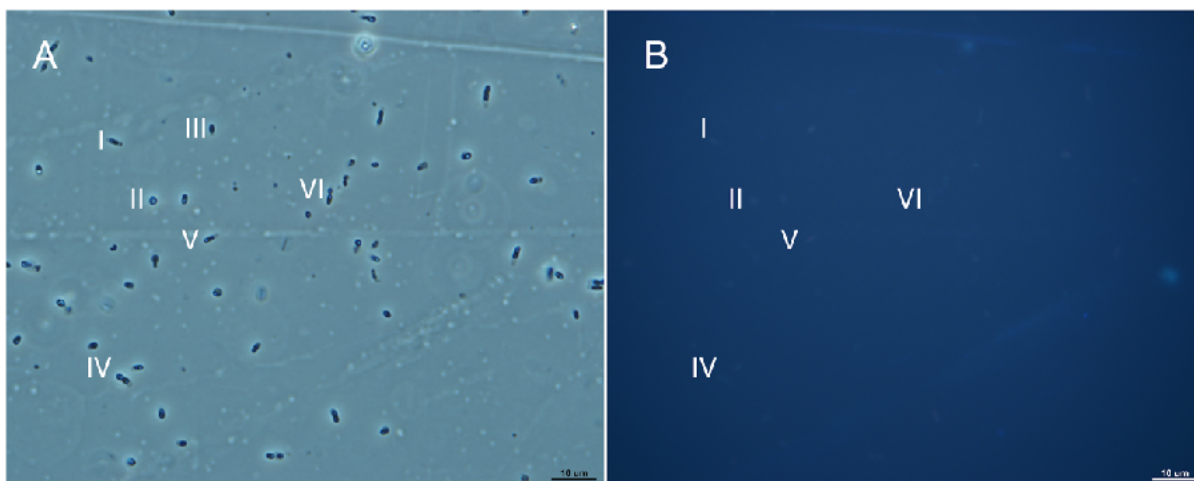


Assim como a cultura 14, a cultura 18 apresentou basicamente a mesma diversidade morfológica em diferentes períodos de observação, havendo predomínio de bacilos de diferentes tamanhos (Figura 56). E mesmo não produzindo metano havia morfologias fluorescentes (Figura 57. B).

**Figura 56.** Morfologias presentes na cultura 18 (10 mM trimetilamina e 10 mM metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) aos 23 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo pequeno; (II) Bacilo escuro; (III) Bacilo com “espaço” e (IV) Coco escuro; (B) (I) Diplobacilo; (II) Bacilo com “espaço”; (III) Bacilo pequeno e (IV) Bacilo com grânulos; sob contraste de fase.



**Figura 57.** Morfologias presentes na cultura 18 (10 mM trimetilamina e 10 mM metanol sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) aos 322 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo com “espaço”; (II) Coco irregular; (III) Bacilo menor com “espaço”; (IV) Diplobacilo com “espaço” e grânulos; (V) Bacilo com “espaço” e grânulo e (VI) Bacilo com “espaço”; sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo com “espaço”; (II) Coco irregular; (IV) Diplobacilo com “espaço” e grânulos e (VI) Bacilo com “espaço”; fluorescendo sob UV.



## 5.6 Produção de metano e caracterização morfológicas das culturas do repique 3 (R3)

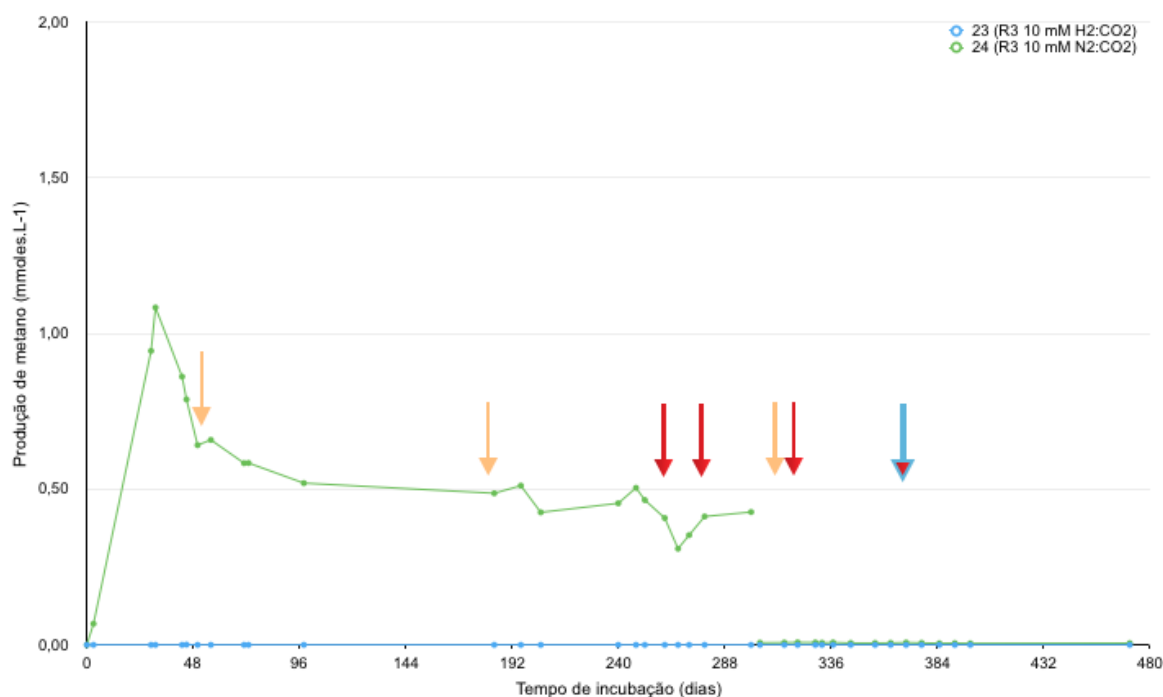
O terceiro repique (R3) foi realizado aos 225 dias de cultivo do R2. Neste período, havia produção de metano e consequentemente arqueias metanogênicas ativas. Só foram realizados repiques das culturas contendo 5 mM e 10 mM de cada substrato sob atmosfera de  $\text{H}_2:\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  (culturas 19, 20, 23 e 24).

Apenas as culturas 19 (R3 5 mM  $\text{H}_2:\text{CO}_2$ ) e 24 (R3 10 mM  $\text{N}_2:\text{CO}_2$ ) produziram metano, mas após realimentação não voltaram a produzir. Dessa forma, as culturas deste repique foram apenas monitoradas quanto à produção de metano e caracterização morfológica através de microscopia de contraste de fase e fluorescência. Amostras para extração e sequenciamento de DNA foram retiradas para possível análise posterior.

### 5.6.1 Culturas alimentadas com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $\text{H}_2:\text{CO}_2$ e $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (culturas 23 e 24)

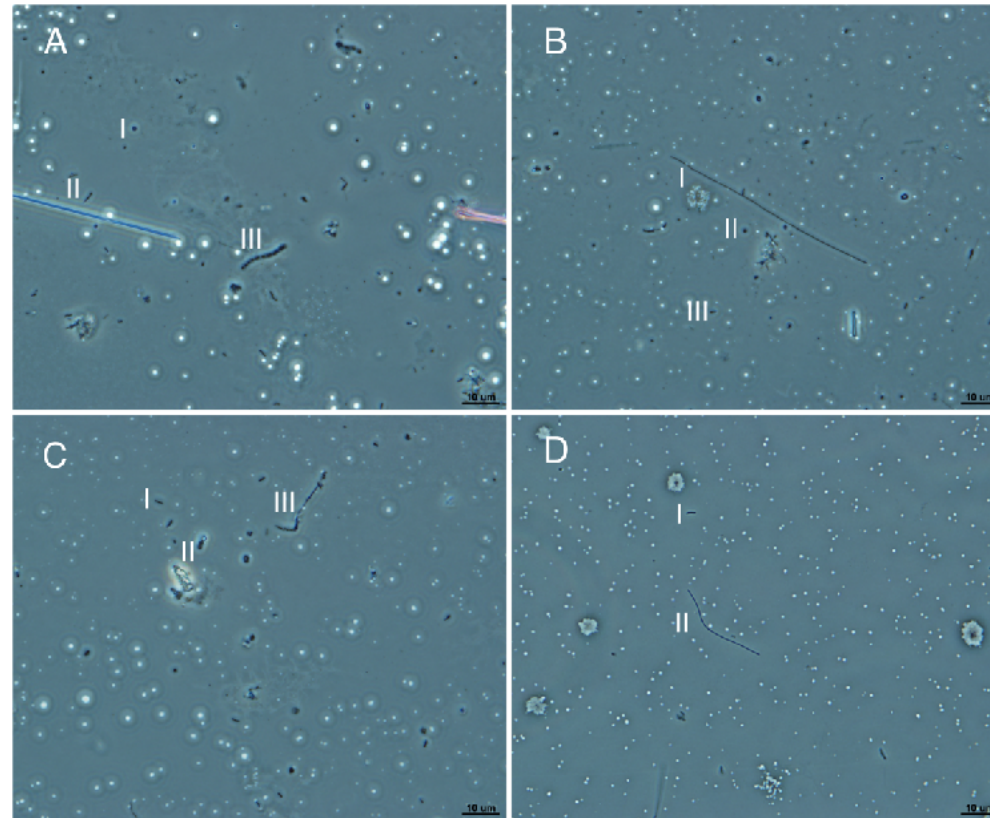
Ao contrário das culturas do R2 citadas anteriormente, apenas a cultura sob atmosfera de  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  produziu metano, entretanto, a produção foi observada em três dias de incubação e alcançou o pico máximo de produção aos 31 dias de incubação, correspondendo a  $1,08 \text{ mmoles.L}^{-1}$  de metano (24,3%). Como esperado, a cultura contendo o dobro da concentração de ambos substratos produziu aproximadamente o dobro de metano. Após realimentação e troca de atmosfera aos 303 dias de incubação a cultura não voltou a produzir metano (Figura 58).

**Figura 58.** Produção de metano pelas culturas 23 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $\text{H}_2:\text{CO}_2$ ) em azul e I 24 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $\text{N}_2:\text{CO}_2$ ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.

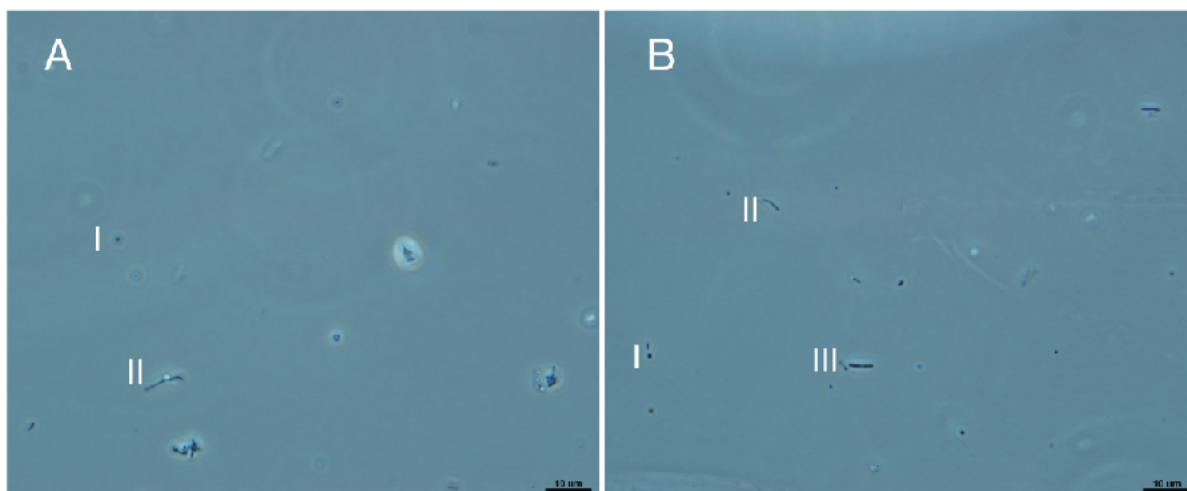


Apesar de não produzir metano, foi observada uma grande diversidade de morfologias na cultura 23, especialmente de bacilos de diferentes tamanhos (Figura 59). Entretanto, a quantidade de células era inferior quando comparada com culturas produtoras de metano (Figura 61).

**Figura 59.** Morfologias presentes na cultura 23 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 275 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco; (II) Bacilo escuro e (III) Bacilo grosso segmentado. (B) (I) Bacilo fino e comprido; (II) Coco escuro e (III) Bacilo pequeno. (C) (I) Bacilo pequeno; (II) Diplococo e (III) Bacilo comprido segmentado. (D) (I) Bacilo escuro e (II) Bacilo fino e comprido; sob contraste de fase.

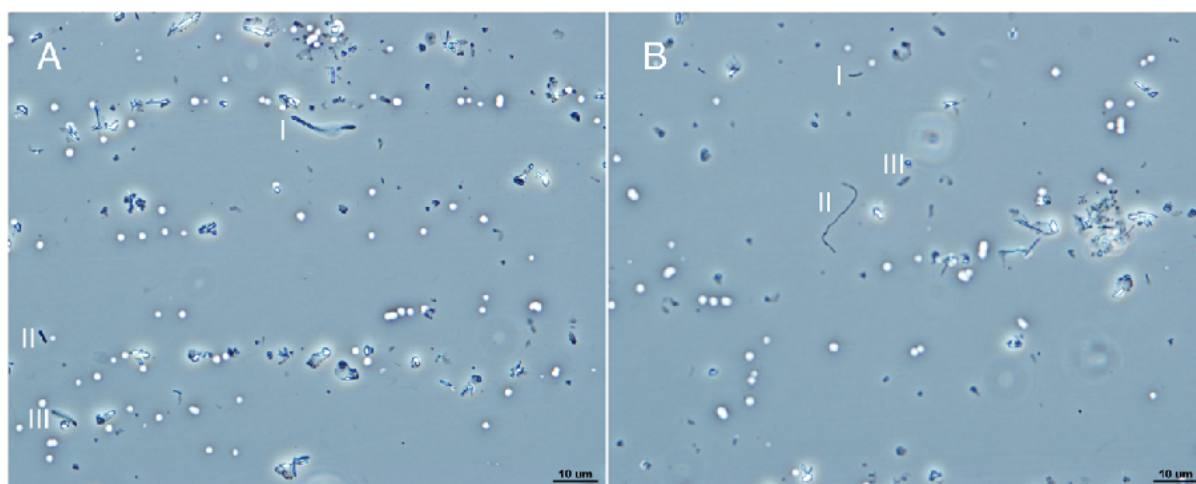


**Figura 60.** Morfologias presentes na cultura 23 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco escuro e (II) Bacilo pequeno; (B) (I) Coco escuro; (II) Bacilo pequeno e (III) Diplobacilo escuro; sob contraste de fase.



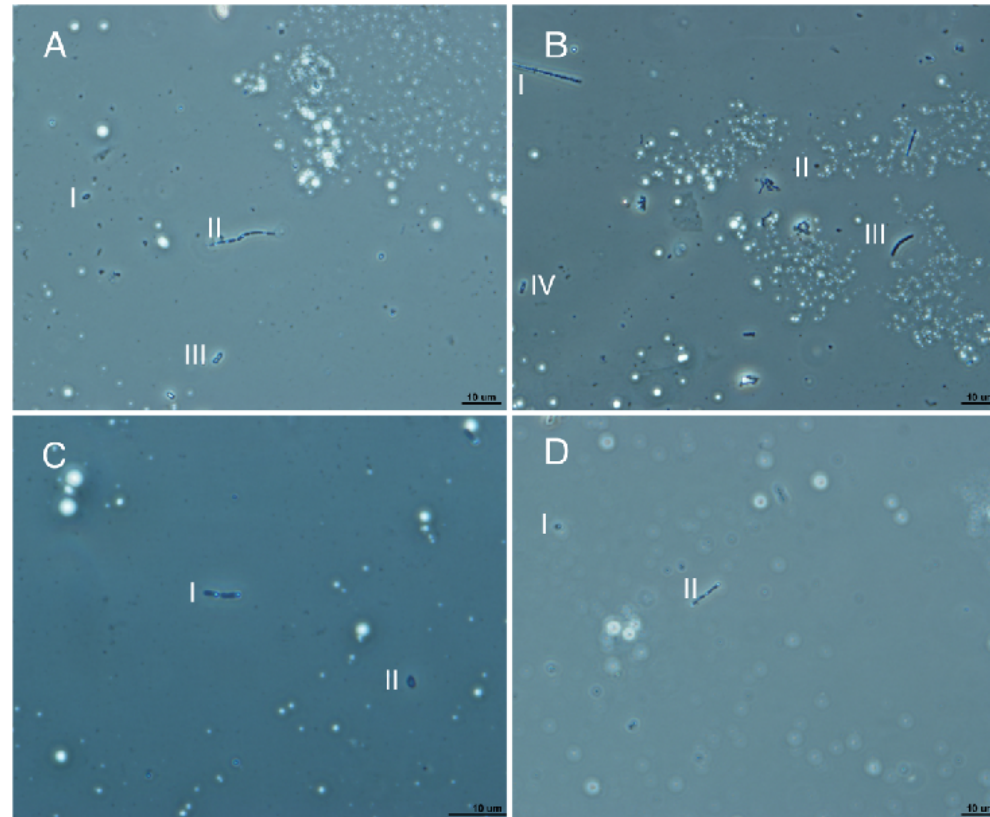
No geral, algumas morfologias foram observadas em ambos os períodos, como por exemplo bacilos escuros (Figura 61), entretanto, aos 275 dias de incubação da cultura 24 foram observadas morfologias que não estavam presentes antes, como cocos escuros e estreptobacilos com grânulos (Figura 62).

**Figura 61.** Morfologias presentes na cultura 24 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 252 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Estreptobacilo escuro; (II) Diplobacilo escuro e (III) Bacilo pequeno. (B) (I) Bacilo escuro e (III) Bacilo fino e comprido; sob contraste de fase.





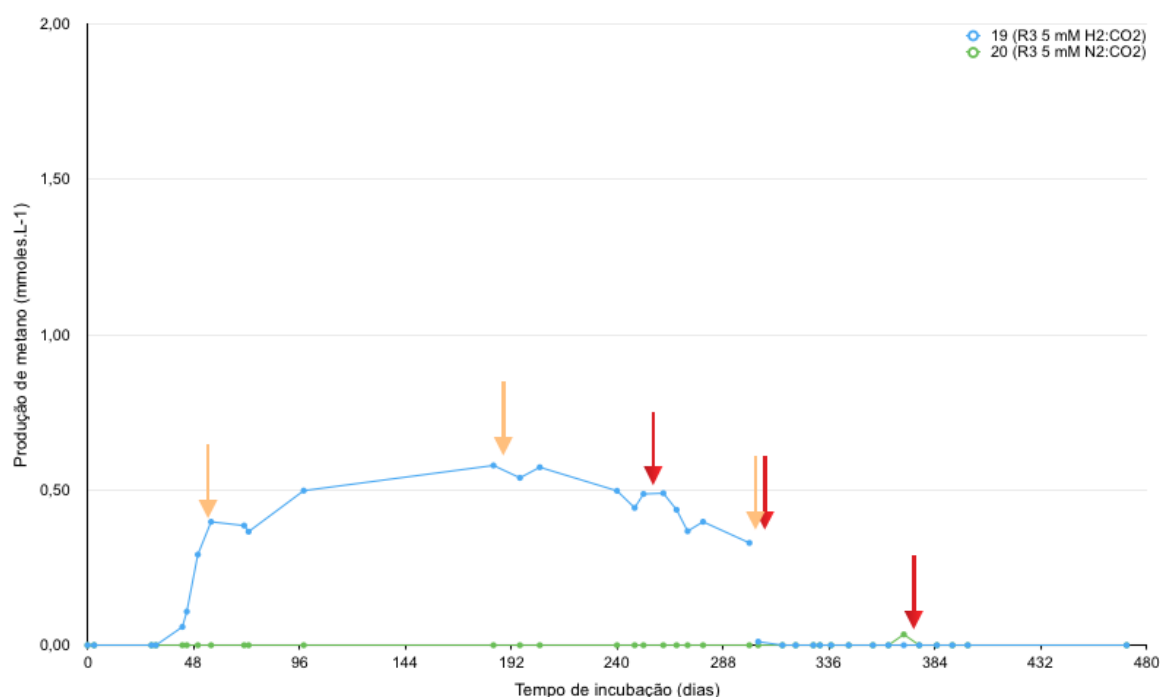
**Figura 62.** Morfologias presentes na cultura 24 (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 275 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco irregular; (II) Estreptobacilo escuro com grânulos e (III) Diplococo. (B) (I) Bacilo fino com grânulos; (II) Coco escuro; (III) Bacilo escuro e (IV) Bacilo com grânulo (C) (I) Diplobacilo com grânulos e (II) Coco irregular. (D) (I) Coco irregular e (II) Estreptobacilo com grânulos; sob contraste de fase.



### 5.6.2 Culturas alimentadas com 5 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $H_2:CO_2$ e $N_2:CO_2$ (culturas 19 e 20)

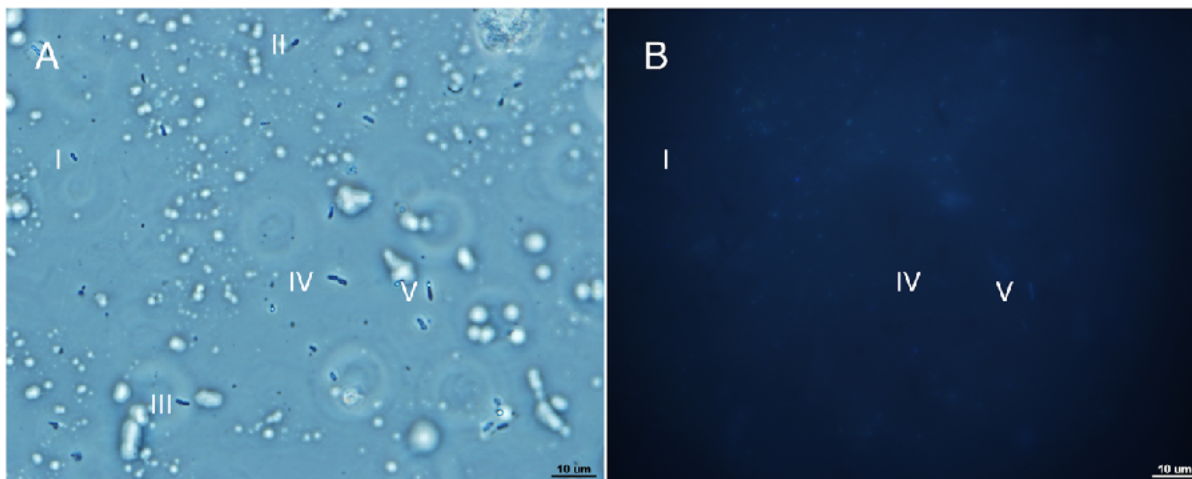
Apenas a cultura sob atmosfera de  $H_2:CO_2$  produziu metano. A produção iniciou após 43 dias de incubação e atingiu o pico máximo aos 205 dias de incubação, correspondendo a  $0,573 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$  de metano (12,8%). Após realimentação e troca de atmosfera aos 303 dias de incubação a cultura não voltou a produzir metano, entretanto, foi observada queda na concentração de hidrogênio na atmosfera do frasco, chegando a zero aos 399 dias de incubação, o que pode indicar que algum micro-organismo utilizou o hidrogênio como substrato (Figura 63).

**Figura 63.** Produção de metano pelas culturas 19 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul e 20 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) em verde. Os pontos desconectados indicam realimentação e troca de atmosfera. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA.

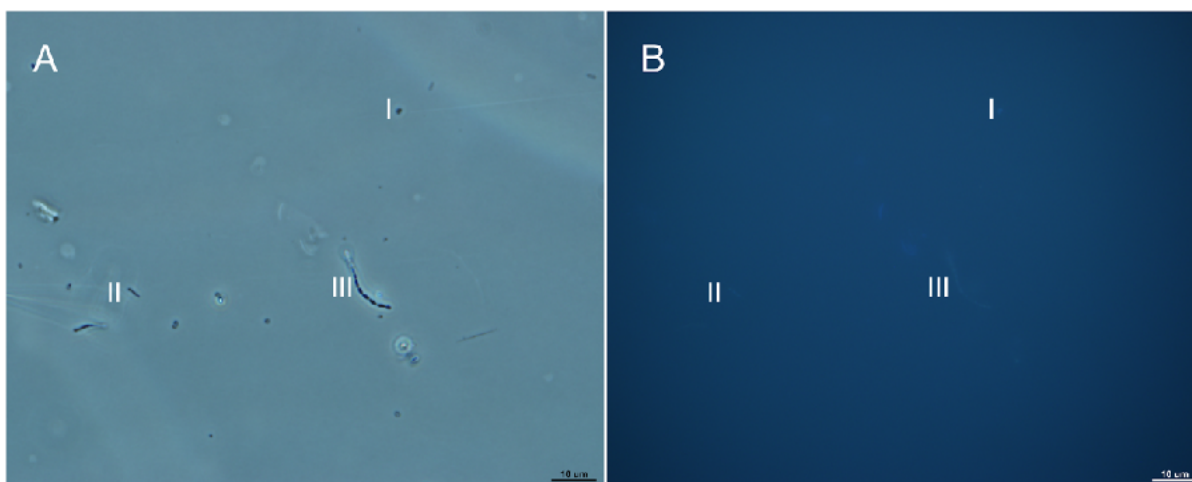


Ao longo do período de incubação não foram observadas alterações na predominância de morfologias. Em todas as observações a maior parte das células eram bacilos, variando apenas no tamanho e comprimento (Figura 64). Apesar de algumas morfologias serem fluorescentes, a fluorescência era fraca (Figura 65. B).

**Figura 64.** Morfologias presentes na cultura 19 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 303 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo escuro; (II) Bacilo com “espaço”; (III); (IV) Diplobacilo escuro e (V) Bacilo com grânulo; sob contraste de fase. (B) (I) Bacilo escuro; (IV) Diplobacilo escuro e (V) Bacilo com grânulo; fluorescendo sob UV.



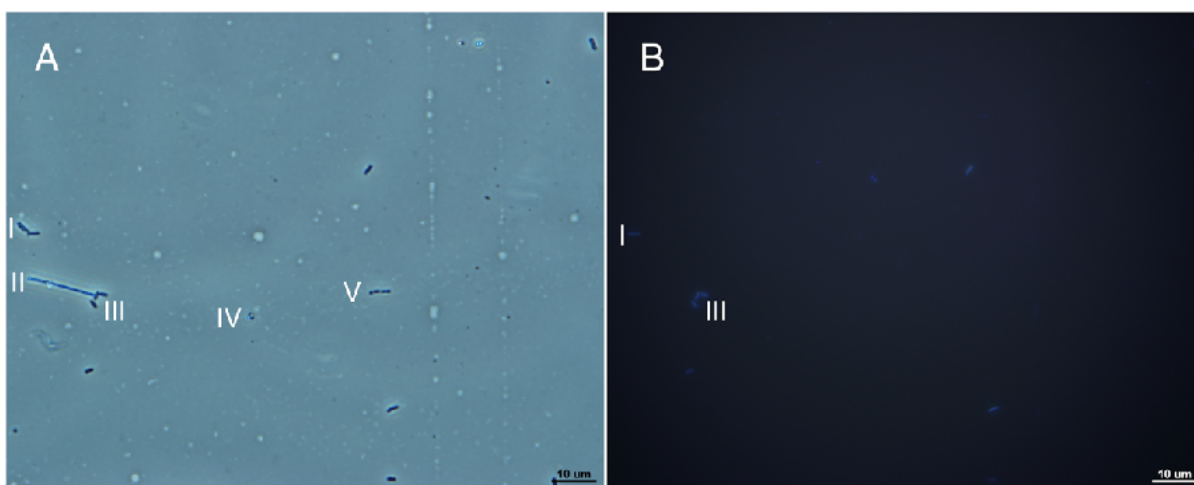
**Figura 65.** Morfologias presentes na cultura 19 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (I) Coco escuro; (II) Bacilo escuro e (III) Estreptobacilo escuro; sob contraste de fase (B) (I) Coco escuro; (II) Bacilo escuro e (III) Estreptobacilo escuro; fluorescendo sob UV.



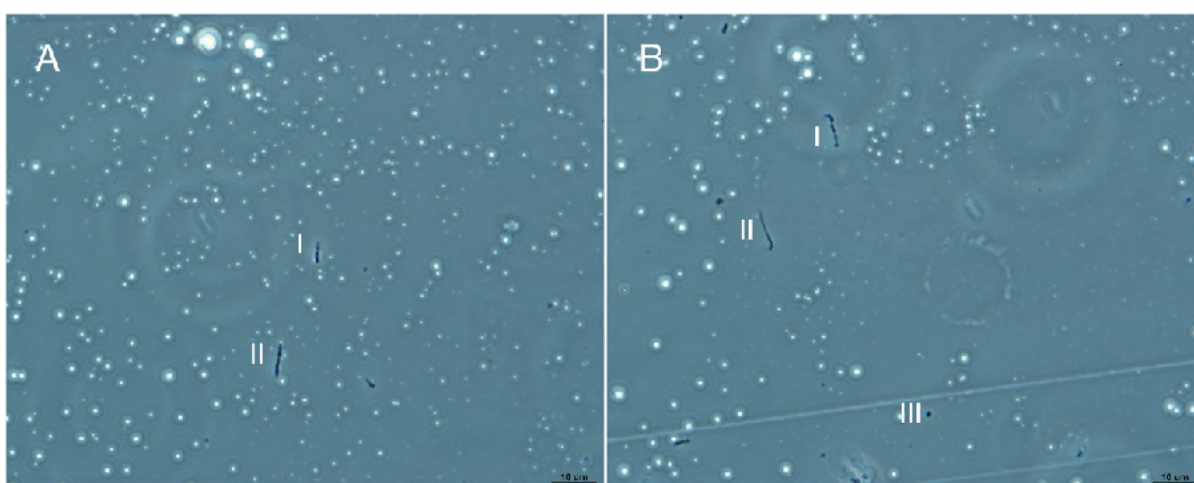


Apesar de não produzir metano, a cultura 20 apresentava algumas morfologias fluorescentes, principalmente bacilos (Figura 66. B). A quantidade de células era inferior quando comparada com as culturas de gerações anteriores e que produziam metano (Figura 67).

**Figura 66.** Morfologias presentes na cultura 20 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 303 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilos escuros; (II) Bacilo fino e comprido com grânulos; (III) Bacilos escuros; (IV) Células esféricas translúcidas e (V) Bacilo segmentado; sob contraste de fase (B) (I) e (III) Bacilos escuros; fluorescendo sob UV.



**Figura 67.** Morfologias presentes na cultura 20 (5 mM de metanol e 5 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 372 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Diplobacilo escuro e (II) Bacilo escuro. (B) (I) Estreptobacilo escuro; (II) Bacilo fino e (III) Coco escuro; sob contraste de fase.



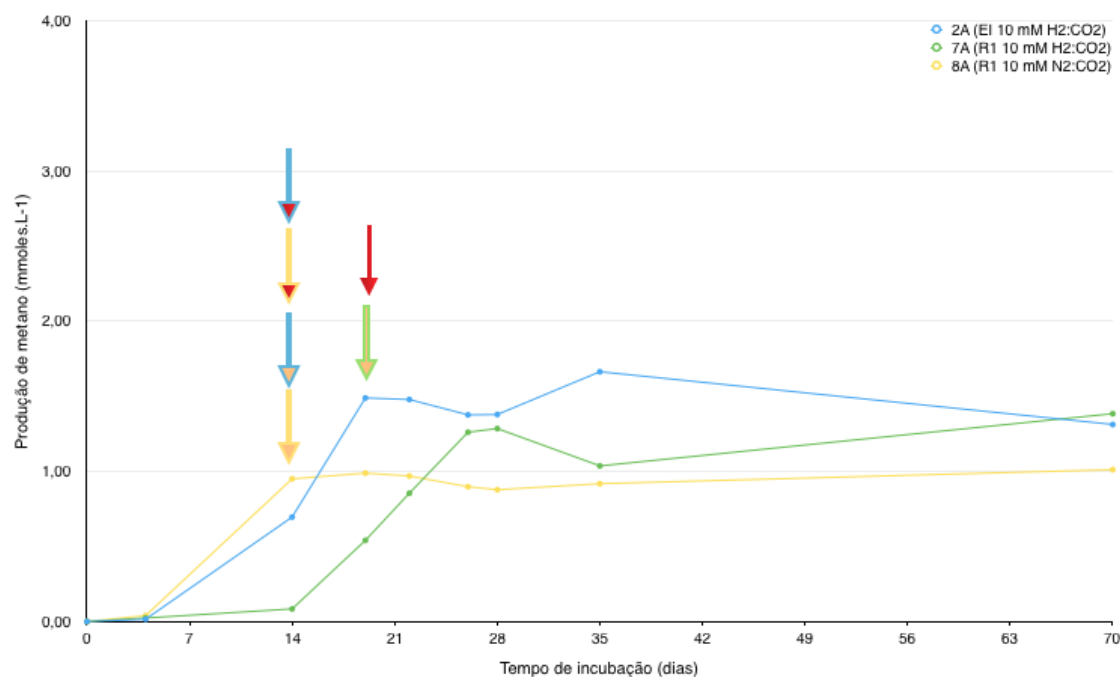
### **5.7 Repique das culturas selecionadas alimentadas com 10 mM de metanol e trimetilamina, sob atmosfera de $\text{H}_2:\text{CO}_2$ ou $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (culturas 2A, 7A e 8A)**

Após experimento de enriquecimento, foram escolhidas as culturas do enriquecimento inicial (EI) e repique 1 (R1) contendo 10 mM dos substratos que ainda estavam ativas e respondiam à realimentação, dessa forma, foram repicadas as culturas 2, 7 e 8 utilizando 50% da cultura como inóculo.

Apesar das culturas 2A e 7A apresentarem as mesmas condições de cultivo, a cultura 2A produziu mais metano, correspondendo a  $1,66 \text{ mmoles.L}^{-1}$  (37,2%) que a 7A que produziu  $1,38 \text{ mmoles.L}^{-1}$  (30,9%). Além disso, a cultura 2A produziu metano em 14 dias de incubação, assim como a cultura 8A, enquanto a cultura 7A começou a produzir metano neste período. A cultura 8A, que diferia das outras duas pela presença de  $\text{N}_2:\text{CO}_2$  na atmosfera do frasco, produziu  $1,01 \text{ mmoles.L}^{-1}$  (22,6%) de metano (Figura 68).

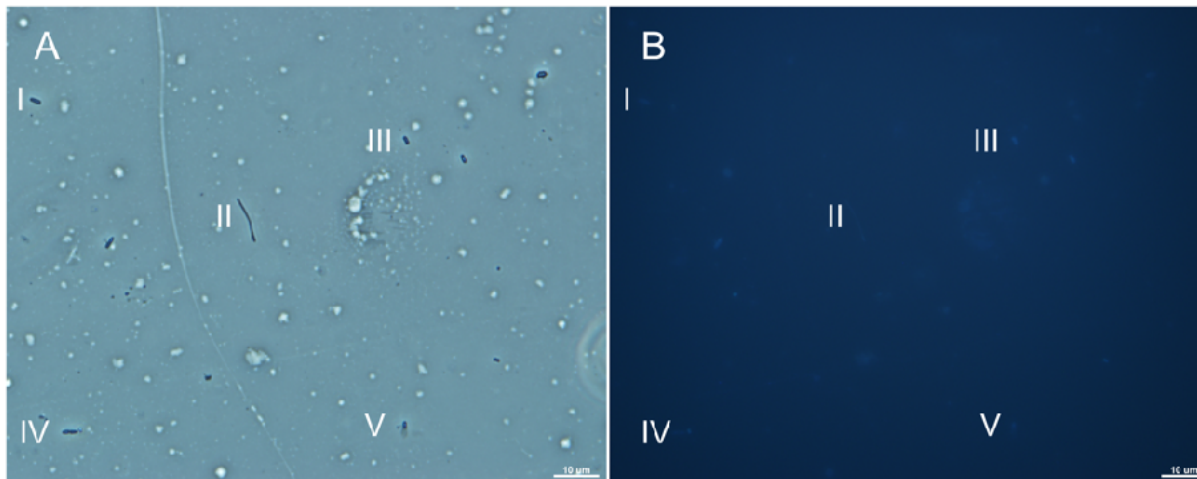
Algo que foi observado nas três culturas e que também foi observado em outros repiques (como as culturas 7, 8, 15 e 16) foi a ocorrência de picos de produção de metano, seguidos de estabilização, queda e novamente um pico de produção que nessas três culturas, este último pico coincidiu com o pico máximo de produção de metano.

**Figura 68.** Produção de metano pelas culturas 2A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em azul; 7A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) em verde e 8A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) em amarelo. As setas vermelhas indicam retirada de amostra para microscopia; as laranjas indicam retirada de amostra para extração de DNA. A cor do contorno da seta indica de qual cultura foi retirada amostra e a ausência de contorno indica que foi retirada amostra em ambas as culturas.



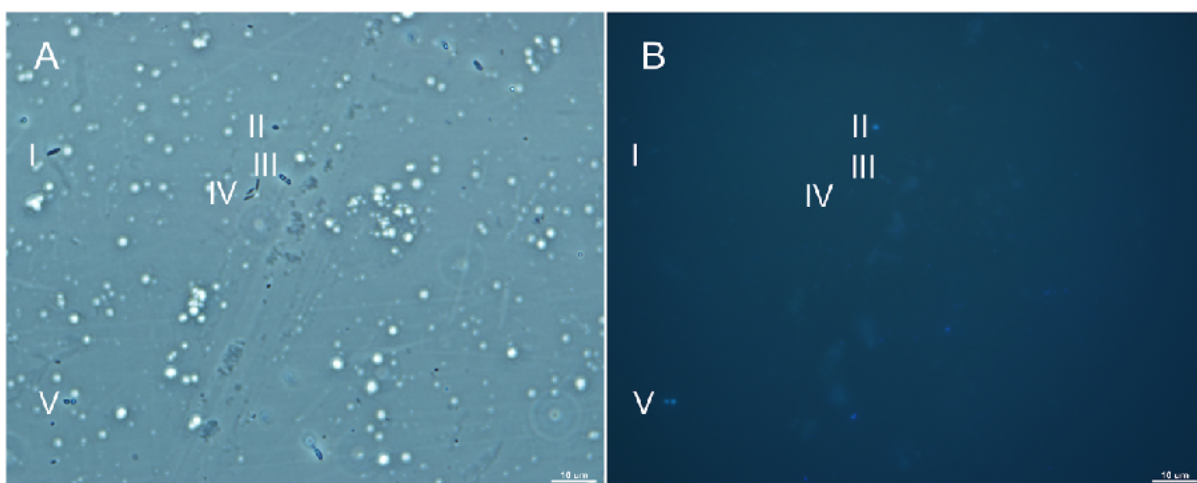
A cultura 2A apresentava grande diversidade de bacilos fluorescentes de diferentes tamanhos e comprimentos (Figura 69), embora todas com fluorescência fraca.

**Figura 69.** Morfologias presentes na cultura 2A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 14 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo curto; (II) Bacilo fino; (III) Bacilos curto; (IV) Diplobacilo e (V) Bacilo curto; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo curto; (II) Bacilo fino; (III) Bacilos curto; (IV) Diplobacilo e (V) Bacilo curto; fluorescendo sob UV.



A cultura 7A apresentava a mesma condição de cultivo da cultura 2A, entretanto, foram observadas algumas morfologias distintas, como por exemplo cocos irregulares. É possível observar que a fluorescência dos cocos irregulares é mais forte que das outras morfologias (Figura 70.B).

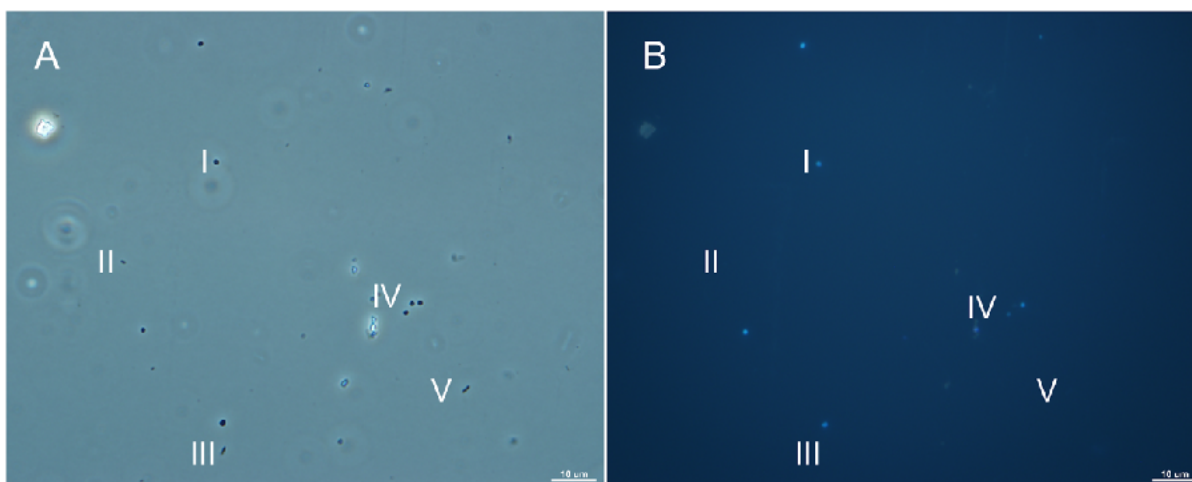
**Figura 70.** Morfologias presentes na cultura 7A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ) com 19 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Bacilo curto; (II) Coco irregular; (III) Bacilo com “espaço”; (IV) Bacilos escuros e (V) Cocos irregulares; sob contraste de fase (B) (I) Bacilo curto; (II) Coco irregular; (III) Bacilos com “espaço”; (IV) Bacilos escuros e (V) Cocos irregulares; fluorescendo sob UV.



Assim como a cultura 7A a cultura 8A também apresentava cocos irregulares (Figura 71) com fluorescência mais forte que nas outros morfologias. Embora

houvesse a presença de bacilos de diferentes tamanhos, o predomínio era de cocos irregulares.

**Figura 71.** Morfologias presentes na cultura 8A (10 mM de metanol e 10 mM de trimetilamina sob atmosfera de  $N_2:CO_2$ ) com 19 dias de incubação. Aumento 1000x. (A) (I) Coco irregular; (II) Bacilo curto; (III) Bacilo; (IV) Cocos irregulares e (V) Diplobacilo; sob contraste de fase (B) (I) Coco irregular; (II) Bacilo curto; (III) Bacilo; (IV) Cocos irregulares e (V) Diplobacilo; fluorescendo sob UV.

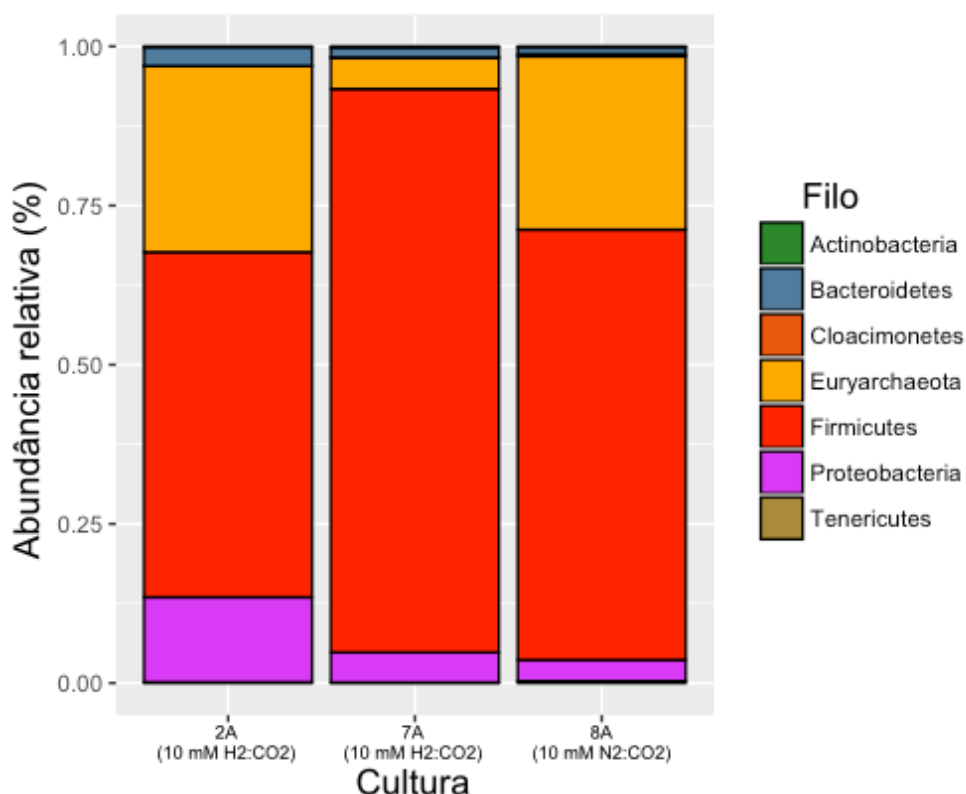


#### 5.7.1 Análise de sequenciamento das culturas selecionadas alimentadas com 10 mM de metanol e trimetilamina

Foram enviadas amostras de DNA extraído das culturas 2A, 7A e 8A no momento de produção de metano e após análise foram obtidas 291.539 sequências que foram classificadas em 89 OTUs.

A composição dos filos nas 3 culturas foi semelhante, só variava a abundância relativa de cada filo em cada cultura. O filo mais abundante nas culturas 2A, 7A e 8A era *Firmicutes* (54,1%, 88,0% e 67,1%, respectivamente), seguido por *Euryarchaeota* (29,0%, 5,1% e 27,0%), *Proteobacteria* (13,5%, 5,0% e 3,5%) e *Bacteroidetes* (3,0%, 1,6% e 1,2%) (Figura 72). A composição da comunidade a nível de filo foi similar nas culturas do R1 e nas culturas selecionadas.

**Figura 72.** Abundância relativa dos filos de bactéria e arqueia presentes nas culturas 2A, 7A e 8A.



Em relação à abundância relativa de gêneros, a composição das comunidades das culturas 7A e 8A era mais semelhante quando comparada à cultura 2A (Figura 73). É possível observar que como as culturas anteriores, 7 e 8, eram de um mesmo repique, as culturas 7A e 8A apresentavam a composição da comunidade mais semelhante entre si.

Nas 3 culturas havia uma grande proporção de bactérias não cultivadas (50,4%, 64,5% e 37,9%), além dos gêneros *Methanococcoides* (29,0%, 5,0% e 27,0%) e *Sedimentibacter* (4,0%, 16,0% e 21,3%).

Os cocos irregulares observados na microscopia das três culturas provavelmente são organismos do gênero *Methanococcoides*. A menor abundância relativa de arqueias metanogênicas na cultura 7A provavelmente está associada ao momento de retirada de amostra para extração de DNA que ocorreu aos 19 dias de incubação, enquanto o primeiro pico de produção de metano foi aos 26 dias.

Apenas nas culturas 7A e 8A havia a presença de organismos pertencentes aos gêneros bacterianos *Carnobacterium* (5,0% e 6,5%) e *Desulfobacterium* (4,6% e 3,0%). O gênero *Desulfobacterium* foi anteriormente observado nas culturas 7 e 8 (em menor abundância), que serviram de inóculo para as culturas 7A e 8A.



O gênero *Carnobacterium* é encontrado em ambientes polares (FRANZMANN et al., 1991; BRATINA et al., 1998; LAURO et al., 2007; TOFFIN et al., 2004), são gram-positivos e fermentadores, produzindo ácido láctico a partir de glicose, mas são capazes de catabolizar uma diversidade de carboidratos (LEISNER et al., 2007).

As espécies *C. funditum* e *C. alterfunditum* foram isoladas do Ace Lake na Antártica. São fermentadores, produzem ácido láctico a partir de glicose e crescem anaerobicamente a 20 °C. O isolado foi obtido ao acaso na tentativa de enriquecer metanogênicas em água do mar sintética sob atmosfera de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, mas estes organismos não são capazes de reduzir CO<sub>2</sub> na presença de H<sub>2</sub>. Acredita-se que esse gênero cumpra um importante papel na obtenção de um ambiente reduzido, pois quando foram cultivados aerobicamente, tornavam o meio incolor na presença de resazurina. Em culturas novas as células eram gram-positivas e os bacilos ocorriam em pares ou em cadeias curtas, entretanto, em culturas mais velhas as cadeias tendiam a serem maiores. Extrato de levedura foi necessário para o crescimento (FRANZMANN et al., 1991).

Os gêneros *Desulfoconvexum* (9,2%) e *Desulfobacula* (4,1%) foram observados apenas na cultura 2A. Ambos gêneros compreendem organismos redutores de sulfato.

O gênero *Desulfoconvexum* foi descrito a partir do isolamento de um representante a partir de amostras de sedimento marinho. Os organismos pertencentes a esse gênero são estritamente anaeróbios, psicrófilicos e redutores de sulfato. As células são gram-negativas e apresentam forma de bacilos ligeiramente curvos ou vibrios. São capazes de crescer quimiolitotroficamente na presença de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> ou bicarbonato (KÖNNEKE et al., 2013), o que explica a presença desse gênero.

Organismos pertencentes ao gênero *Desulfobacula* são redutores de sulfato estritamente anaeróbios, apresentam células gram-negativas e com formato de cocos ovais que podem ocorrer sozinhos ou em pares. São capazes de usar etanol, propanol, tolueno e outros compostos aromáticos como doadores de elétrons e fonte de carbono. Sulfato e outros compostos com enxofre podem servir como aceptor de elétrons (KUEVER, RAINEY e WIDDEL, 2015).

A queda de metano na atmosfera dos frascos aparentemente não teve causa biológica, uma vez que não foram observados nas análises de sequenciamento





## 6. CONCLUSÕES

O cultivo de arqueias metanogênicas a partir de sedimento marinho das proximidades da geleira Wanda, Baía do Almirantado, Península Antártica, utilizando substratos metilotróficos em meio mineral salino foi bem sucedido. A caracterização das culturas obtidas permitiu as seguintes conclusões:

- A trimetilamina foi o substrato preferencial das arqueias metanogênicas enriquecidas nos cultivos;
- As culturas contendo trimetilamina e metanol como substrato metilotrófico produziram mais metano do que as culturas alimentadas apenas com metanol;
- Dentre os grupos metanogênicos, foram identificados os gêneros *Methanococcoides* e *Methanosarcina*, que foi mais abundante em culturas sob atmosfera de  $H_2:CO_2$ ;
- Os substratos metilotróficos (metanol e trimetilamina) selecionaram comunidades distintas;
- A composição das culturas sofreu alterações ao longo dos períodos de incubação e associadas à produção de metano. No período de maior produção de metano, a composição de algumas culturas foi quase exclusivamente de grupos metanogênicos. Entretanto, amostras analisadas em estágios e repiques diferentes das culturas mostraram também a presença de bactérias heterotróficas, fermentadoras, redutoras de sulfato e grupos não cultivados em relativa abundância;
- Os repiques sucessivos das culturas não foram bem sucedidos, indicando a necessidade de fatores não fornecidos pelo meio (possivelmente presentes no inóculo ou derivados da interação entre grupos microbianos);
- Em relação às morfologias observadas em todas as culturas, as arqueias metanogênicas foram associadas a cocos, enquanto bacilos de diferentes tamanhos foram as morfologias predominantes provavelmente associadas às bactérias;
- A técnica de roll-tube resultou no crescimento de colônias de diversos gêneros de bactérias, mas não foi possível isolar linhagens de arqueias metanogênicas;
- Houve dificuldade em se obter colônias isoladas através da técnica do roll-tube. O crescimento frequente de colônias sobrepostas, o crescimento de grupos reconhecidamente aeróbios ou ainda colônias compostas por diversos grupos

microbianos indicam a necessidade de aprimorar a técnica ou de adotar abordagens distintas que permitam o estudo das comunidades mistas, preservando possíveis relações de simbiose.

- As células fluorescentes observadas nas culturas de roll-tube foram associadas ao filo *Actinobacteria* e não a grupos metanogênicos, mostrando que a característica de autofluorescência sob luz UV para detecção de células metanogênicas deve ser usada com parcimônia.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALBERS, S. V. e MEYER, B. H. (2011) The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol* 9(6):414–426.
- ALLAN, W., STRUTHERS, H. e LOWE, D. C., (2007) Methane carbon isotope effects caused by atomic chlorine in the marine boundary layer: Global model results compared with Southern Hemisphere measurements. *J. Geophys. Res. Atmos.*, 112, D04306.
- AMAP Assessment 2015: Methane as an Arctic climate forcer. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway. vii + 139 pp.
- ARIGONY-NETO, J., *et al.* (2006). Monitoring snow parameters on the Antarctic Peninsula using satellite data: A new methodological approach. *EARSeL e Proceedings*, Paris, 5(1): 100-110.
- ARISTILDE, L. (2017) Metabolite labelling reveals hierarchies in *Clostridium acetobutylicum* that selectively channels carbons from sugar mixtures towards biofuel precursors. *Microb Biotechnol* 10: 162–174.
- BAIK, K.S. *et al.* (2008). Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland. *J. Microbiol.* 46, 647–655.
- BALK, M.; WEIJMA, J.; STAMS, A. J. M. (2002) *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52 (pt 4):1361–1368.
- BAJERSKI, F. e WAGNER, D. (2013) Bacterial succession in Antarctic soils of two glacier forefields on Larsemann Hills, East Antarctica. *FEMS microbiology ecology*, v. 85, n. 1, p. 128-142, 2013.
- BARNS, S.M., *et al.* (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9188–93.
- BATES, S.T., *et al.* (2011) Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 5:908–17.
- BD Bionutrients™. Technical Manual. Advanced Bioprocessing. Terceira Edição. p. 25-29 Disponível em: <[https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients\\_tech\\_manual.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients_tech_manual.pdf)> BD Bionutrients™ Technical Manual Advanced Bioprocessing>.
- BERGMANN, G. T *et al.* (2011). The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem* 43: 1450–1455.
- BITTON, G. (2005) *Wastewater Microbiology*. 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2005.

BLAINEY, P. C., *et al.* (2011) Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing Archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis PLoS One, 6, e16626.

BLANK, C.E. (2009) Not so old Archaea – the antiquity of biogeochemical processes in the archaeal domain of life. *Geobiology* 7, 495–514.

BOONE, D. R. (2015) *Methanolobus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–7.

BOONE, D. R. (2015) *Methanohalophilus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–4.

BOONE, D. R. e MAH, R. A. (2015) *Methanosarcina*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–15.

BORREL, G. *et al.* (2012) Genome sequence of “Candidatus *Methanomethylophilus alvus*” Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *J Bacteriol* 2012;194: 6944–5.

BORREL, G. *et al.* (2013) Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome biology and evolution*, v. 5, n. 10, p. 1769-1780, 2013.

BOWMAN, J. P., MCCAMMON, S. e DANN, A. (2003) Biogeographic and Quantitative Analyses of Abundant Uncultivated  $\alpha$ -Proteobacterial Clades from Marine Sediment. *Microb Ecol* (2005) 49: 451. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0070-2>.

BOWMAN, J. P. e MCCUAIG, R. D. (2003). Biodiversity, community structure shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2463–2483. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.5.2463-2483.2003>.

BOWMAN, J. P. e MCMEEKIN, T. A. (2015). *Pseudoalteromonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi:10.1002/9781118960608.gbm01098

BRATINA, B. J., *et al.* (1998) Manganese reduction by microbes from oxic regions of the Lake Vanda (Antarctica) water column. *Appl Environ Microbiol* 64: 3791–3797.

BROWN, D. R. (2015). *Tenericutes*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi:10.1002/9781118960608.pbm00025

BRUGERE, J. F. *et al.* (2013) Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes* 2013;5:5–10.

BRUNE, A. (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends Biotechnol.*

16: 16–21.

BULL, A.T. et al.(2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87(3):65–79.

CARERE, C. R. et al. (2017) Mixotrophy drives niche expansion of verrucomicrobial methanotrophs. *The ISME journal*, v. 11, n. 11, p. 2599, 2017.

CAPORASO, J.G. et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4516–4522.

CARDENAS E. e TIEDJE J. M. (2008) New tools for discovering and characerizing microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 19:544–549.

CASTELLE, C. J. et al., (2015) Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr. Biol.* 25,690–701 (2015). doi:10.1016/j.cub.2015.01.014;pmid: 25702576.

CAVICCHIOLI, R. (2006) Cold-adapted archaea. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:331–43.

CAVICCHIOLI, R. (2015) Microbial ecology of Antarctic aquatic systems. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 13, n. 11, p. 691, 2015.

CHABAN B., NG, S.Y.M., JARRELL, K.F. (2006) Archaeal habitats—from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* 52:73–116.

CHANDLER, S. R. (1983) The utilization of methylamine-nitrogen by the methazotrophic bacterium *Pseudomonad* P. PhD thesis (University of Reading, Reading, Berkshire, UK).

CHEN, Y. et al. (2011) Bacterial flavin-containing monooxygenase is trimethylamine monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 43, p. 17791-17796, 2011.

CHISTOSERDOVA L., et al. (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea. *Science* 281:99–102.

CHISTOSERDOVA L., LIDSTROM M. E. (2013). Aerobic methylotrophic prokaryotes. In: Rosenberg E, DeLong EF, Thompson F, Lory S, Stackebrandt E (eds), *The Prokaryotes*, 4th edn, Springer: Berlin, Hiedelberg, pp 267–285.

CHISTOSERDOVA, L. (2015). Methylotrophs in natural habitats: current insights through metagenomics. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(14), 5763-5779.

CIAIS, P., et al; (2013) 2013: Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y.

Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

CLEARY, D. F. R. et al. (2017) Sediment depth and habitat as predictors of the diversity and composition of sediment bacterial communities in an inter-tidal estuarine environment. *Marine Ecology*, v. 38, n. 2, 2017.

COLLINS, M.D., et al. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Evol Microbiol* 44: 812–826.

COOK A.J., et al.. (2005). Retreating glacier fronts on the Antarctic Peninsula over the past half-century. *Science*. 2005;308(5721):541–4. doi:10.1126/science.1104235.

COSTA, K. C., LEIGH, J. A. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current opinion in biotechnology*, 29, 70-75.

CZEPIEL, P. M. (2003) The influence of atmospheric pressure on landfill methane emissions. *Waste Manag* 23:593–598. doi: 10.1016/S0956-053X(03)00103-X

COSTELLO, A.M. e LIDSTROM, M. E. (1999) Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl Environ Microbiol* 65:5066–5074.

DE BOK, F. A. M.; et al. (2001) Pathway of Propionate Oxidation by a Syntrophic Culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. *Applied and environmental microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1800-1804, 2001.

DELONG, E.F.; PACE, N.R. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50(4):470–78.

DLUGOKENCKY E.J., et al. (2009) Observational constraints on recent increases in the atmospheric CH<sub>4</sub> burden. *Geophys Res Lett* 36. doi:10.1029/2009gl039780.

DRIDI, B., et al. (2012) *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human feces. *IJSEM* 62:1902–1907.

DUNBAR, J., et al. (2002). Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3035–3045. doi: 10.1128/AEM.68.6.3035-3045.2002

EDGAR, R. C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EHRlich, H.L. e NEWMAN, D. K. (2009) *Geomicrobiology*. Boca Raton, FL: CRC Press. 5th ed. 628 pp.

ELKINS, J.G. et al. (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:8102–7.

EMMETT, M. e KLOOS, W. E. (1975). Amino acid requirements of staphylococci isolated from human skin. *Can J Microbiol* 21:729-733. <https://doi.org/10.1139/m75-107>

EMMETT, M. e KLOOS, W. E. (1979). The nature of arginine auxotrophy in cutaneous populations of staphylococci. *J Gen Microbiol* 110:305-314. <https://doi.org/10.1099/00221287-110-2-305>

ETTWIG, K.F., *et al.* (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*.

EVANS, P. N. (2015) *et al.*, Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science* 350, 434–438 (2015). doi: 10.1126/ science.aac7745; pmid: 26494757.

FAN, J. (2013) *et al.* Diversity and structure of bacterial communities in Fildes Peninsula, King George Island. *Polar biology*, v. 36, n. 10, p. 1385-1399, 2013.

FANG, M. *et al.* (2012) *Brassicibacter mesophilus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium isolated from food industry wastewater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 62, n. 12, p. 3018-3023, 2012.

FITZSIMONS, M. F., *et al.* (2006) Desorption kinetics of ammonium and methylamines from estuarine sediments: consequences for the cycling of nitrogen. *Mar. Chem.* 101, 12-26.

FOONG, C. P.; LING, C. M. W. V.; GONZÁLEZ, M. (2010) Metagenomic analyses of the dominant bacterial community in the Fildes Peninsula, King George Island (South Shetland Islands). *Polar Science*, 2010, 4.2: 263-273.

FLOOD, M. D. (2006) TMA Oxidation in Acetogenesis and Sulfate Reduction. Disponível em <[http://www.mbl.edu/microbialdiversity/files/2012/08/Flood\\_MD2006.pdf](http://www.mbl.edu/microbialdiversity/files/2012/08/Flood_MD2006.pdf)>.

FRANCO, D.C. *et al.* (2017) High Prevalence of Gammaproteobacteria in the Sediments of Admiralty Bay and North Bransfield Basin, Northwestern Antarctic Peninsula. *Front. Microbiol.* 8:153. doi: 10.3389/fmicb.2017.00153.

FRANZMANN, P. D., *et al.* (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Archiv Microbiol* 156: 255–262.

FRANZMANN, P. D., *et al.* (1992) A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 15, 573–581 (1992).

FRANZMANN, P. D. e DOBSON, S. J. (1992) Cell wall-less, free-living spirochetes in Antarctica. *FEMS microbiology letters*, v. 97, n. 3, p. 289-292, 1992.

FRANZMANN, P. D., *et al.* (1997) *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic,

H<sub>2</sub>-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1068–1072 (1997).

FREITAG, T.E. e PROSSER, J.I. (2009) Correlation of methane production and functional gene transcriptional activity in a peat soil. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(21): 6679–668.

FREITAS, S. et al. (2012) Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *The ISME journal*, v. 6, n. 8, p. 1499, 2012.

FUERST, J. A. (2005). Intracellular compartmentation in Planctomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 299–328. doi: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121258

FUJIWARA-ARASAKI, T. e MINO, N., (1972) The distribution of trimethylamine and trimethylamine oxide in marine algae. *Proceedings of the Seventh International Seaweed Symposium*. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 506–510.

GALAGAN, J.E., et al. (2002) The genome of *Methanosarcina acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res* 2002, 12:532–542.

GARCIA, J.L.; PATEL, B.K.C. e OLLIVIER, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205–226.

GARRET, R.A. e KLENK, H.P. (2007) *Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology*. Oxford: Blackwell.

GARZA, D.R. e DUTILH, B.E. (2015) From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72:4287–4308. doi:10.1007/s00018-015-2004-1.

GÄRTNER, A; WIESE, J. e IMHOFF, J. F. (2008) *Amphritea atlantica* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium from the Logatchev hydrothermal vent field. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 58, n. 1, p. 34–39, 2008

GIBB, S. W. e HATTON, A. D. (2004) The occurrence and distribution of trimethylamine-N- oxide in Antarctic coastal waters. *Mar Chem* 91(1–4):65–75.

GIOVANNONI, S. e STINGL, I. U. (2007) The importance of culturing bacterio-plankton in the “omics” age. *Nat Rev Microbiol* 5:820–826.

GITTEL, A.; et al. (2009) Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from high-temperature oil reservoirs with and without nitrate treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7086–96.

CLINGENPEEL, S., et al. (2013). Yellowstone lake nanoarchaeota. *Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 274. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00274>.

GOLYSHINA, O. V. e TTIMMIS, K. N. (2005) *Ferroplasma* and relatives,



recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environ. Microbiol.* 7:1277–88.

GONG, X., et al. (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000;50 (pt 1): 119–125.

GORRIS, L. G. et al. (1988). Relationship between methanogenic co-factor content and maximum specific methanogenic activity of anaerobic granular sludges. *Appl Environ Microbiol* 54, 1126– 1130.

GÖTZ, F.; BANNERMAN, T. e SCHLEIFER, K. (2006) The genera *staphylococcus* and *macrococcus*. In: *The prokaryotes*. Springer US, 2006. p. 5-75.

GREENING, C. et al. (2016) Physiology, biochemistry, and applications of F420- and Fo-dependent redox reactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 2, p. 451-493, 2016.

GUAN, Z., et al. (2013) The polar lipids of *Clostridium psychrophilum*, an anaerobic psychrophile. *Biochim Biophys Acta* 1831: 1108–1112.

GUPTA, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 367e402.

GUPTA, R. S. e GAO, B. (2009) Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium* sensu stricto (cluster I). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 59, n. 2, p. 285-294, 2009.

GUPTA, R. S. e SETHI, M. (2014) Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria and its distinct subclades. *Anaerobe*, v. 28, p. 182-198, 2014.

GUTIERREZ, T. et al. (2016) Enrichment of Fusobacteria in sea surface oil slicks from the Deepwater Horizon oil spill. *Microorganisms*, v. 4, n. 3, p. 24, 2016.

GUY, L. e ETTEMA, T. J. (2011) The archaeal ‘TACK’ superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol.* 19, 580–587 (2011). doi: 10.1016/j.tim.2011.09.002; pmid: 22018741.

HALLAM, S. J. et al. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase a (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5483–5491.

HALLAM, S. J., et al. (2006) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 18296–18301.

HALES, B. A. et al. (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 668–675.

HAROON, M. *et al.* (2013) Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, vol.500, no. 7468, pp. 567–570, 2013.

HARTMANN, D.L. *et al.* (2013) Observations: Atmosphere and Surface. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 159–254, doi:10.1017/CBO9781107415324.008.

HE, Y. *et al.*, (2016) Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. *Nat. Microbiol.* 1, 16035 (2016). doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.35; pmid: 27572832.

HEDLUND, B. P., *et al.* (1997) *Verrucomicrobia* div. nov., a new division of the bacteria containing three new species of *Prostheco bacter*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 72, n. 1, p. 29-38, 1997.

HEDLUND, B. P. (2015). *Verrucomicrobiae*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi:10.1002/9781118960608.cbm00054

HEIJTHUIJSEN, J. H. F. G. e HANSEN, T. A. (1989) Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains. *Archives of Microbiology*, v. 152, n. 4, p. 393-396, 1989.

HIPPE, H. *et al.* (1979) Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 1, p. 494-498, 1979..

HODSON, A. *et al.* (2017) Climatically sensitive transfer of iron to maritime Antarctic ecosystems by surface runoff. *Nature communications*, 2017, 8: 14499.

HOLMES, A. J. *et al.* (1995) Evidence that participate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS microbiology letters*, v. 132, n. 3, p. 203-208, 1995.

HOPE, G. *et al.* (1998) Measurements of glacier variation in the Tibetan Plateau using Landsat data. *Remote Sensing of Environment*, 63: 258-264.

HOSTER, F., DANIEL, R. e GOTTSCHALK, G. (2001) Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase. *The Journal of general and applied microbiology*, v. 47, n. 4, p. 187-192, 2001.

HUBER, H. et al., (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417,63–67 (2002). doi: 10.1038/417063a; pmid: 11986665.

HUBER, H. et al. (2003) The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Research in microbiology*, v. 154, n. 3, p. 165-171, 2003.

HUNGATE, R.E. e MACY, J.. 1973. The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bull. Ecol. Res. Comm.* 17:123–125.

IINO, T., et al. (2013) *Candidatus Methanogranum caenicola*: a novel Methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a Methanogenic lineage of the class thermoplasmata. *Microbes Environ* 2013;28:244–50.

IKENAGA, M. et al. (2004) , Susumu Asakawa , Yoshitetsu Muraoka & Makoto Kimura (2004) Methanogenic archaeal communities in rice roots grown in flooded soil pots: Estimation by PCR-DGGE and sequence analyses, *Soil Science and Plant Nutrition*, 50:5, 701-711, DOI: 10.1080/00380768.2004.10408526.

IMACHI, H. et al. (2007) *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 57, n. 7, p. 1487-1492, 2007.

IMACHI, H. et al. (2011) Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *The ISME journal*, v. 5, n. 12, p. 1913, 2011.

IMACHI, H. et al. (2016) *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 66, n. 3, p. 1293-1300, 2016.

IPCC, 2007. Contribution of working group to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2007. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), *Direct Global Warming Potentials*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA (Chapter 2.10.2).

JARRELL, K. F. et al. (1992) A general method of isolating high molecular weight DNA from methanogenic archaea (archaeobacteria). *Can J Microbiol* 38(1):65–68.

JIANG, B. et al. (2005) *Methanomethylovorans thermophila* sp. nov., a thermophilic, methy- lotrophic methanogen from an anaerobic reactor fed with methanol. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 6):2465–2470.

JIN et al.: (2014) Discovery of a novel rumen methanogen in the anaerobic fungal culture and its distribution in the rumen as revealed by real-time PCR. *BMC*

Microbiology 2014 14:104.

JØRGENSEN, B. B. e KASTEN, S. (2000) Sulfate reduction in marine sediments. In: Marine geochemistry. Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. p. 263-281.

JUNG, C., et al. (2012) Optimization of *Pseudoalteromonas* sp. JYBCL 1 culture conditions, medium composition and extracellular  $\beta$ -agarase activity. Biotechnol. Bioprocess Eng. 17, 937–945.

JUNI, E. (2015). *Acinetobacter*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi:10.1002/9781118960608.gbm01203.

KARTAL B., et al. (2012) Anammox—growth physiology, cell biology, and metabolism. Adv. Microb. Physiol. 60:211–62.

KASTING, J.F. (1993) Earth's early atmosphere. Science 259, 920–926.

KELLER, M.D., et al. (1987) Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. J. Phycol. 23: 633-638.

KERR, R.A. (2005) The story of O<sub>2</sub>. Science 308, 1730–1732.

KIELAK, A. M., et al. (2016) The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 744.

KING, G.M., (1988). Distribution and metabolism of quaternary amines in marine sediments. In: Blackburn, T.H., Sørensen, J. (Eds.), Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 143–173

KING, G.M. (1984). Metabolism of trimethylamine, choline, and glycine betaine by sulfate-reducing and methanogenic bacteria in marine sediments. Appl Environ Microbiol 48: 719–725.

KIRCHMAN, D. L. (2002). The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 91–100. doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x

KNITTEL, K. e BOETIUS, A. (2009) Anaerobic Oxidation of Methane: Progress with an Unknown Process. Annu Rev Microbiol 63(1):311–334.

KOZUBAL, M. A., et al. (2013). Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. ISME J. 7:622–34.

KRIEG, N.R. (2011) Class I. *Bacteroidia* class. nov. In N.R. KRIEG, J.T. STALEY, D.R. BROWN, B.P. HEDLUND, B.J. PASTER, N.L. WARD, W. LUDWIG and W.B. WHITMAN (editors), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 4 (The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*,

*Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*), Springer, New York, 2011, p. 25.

KUEVER, J. , RAINEY, F. A. e WIDDEL, F. (2015). *Desulfobacterium*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi: 10.1002/9781118960608.gbm01012.

KUEVER, J. , RAINEY, F. A. e WIDDEL, F. (2015). *Desulfobacula*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi: 10.1002/9781118960608.gbm01013.

KUIVILA, K. M., et al. (1988). Methane cycling in the sediments of Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* 33: 571- 581.

LANG, K. et al. (2015) New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of “Candidatus Methanoplasma termitum”. *Appl Environ Microb* 2015;81:1338–2352.

LARGE, P.J., BOULTON, C. A. e CRABBE, M. J. C. (1972) The reduced nicotinamide-adenine dinu- clotide phosphate- and oxygen-dependent N-oxygenation of trimethylamine by *Pseudomonas aminovorans*. *Biochem J* 128:137–138.

LAURO, F. M., et al. (2007) The unique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation. *Appl Environ Microbiol* 73: 838–845.

LAZAR, C. S. et al., (2016) Genomic evidence for distinct carbon substrate preferences and ecological niches of Bathyarchaeota in estuarine sediments. *Environ. Microbiol.* 18, 1200–1211 (2016). doi: 10.1111/1462-2920.13142; pmid: 26626228.

LECHNER, U. (2015). *Sedimentibacter*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi: 10.1002/9781118960608.gbm00718.

LEE, Y. E. et al. (1993) Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xyloxyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of ... *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 41-51, 1993.

LEISNER, J. J. et al. (2007) *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS microbiology reviews*, v. 31, n. 5, p. 592-613, 2007.

LE MER J.; ROGER, P. (2001) Production, oxidation, emission and consumption of

methane by soils: a review. *European Journal of Soil Biology*, v.37, p.25-50, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01067-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01067-6).

LIPP, J.S., et al. (2008) Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* 454:991–94;

LIU, Y. et al. (1999) Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 545-556, 1999;

LIU, Y.; BEER, L. L. e WHITMAN, W. B. (2012). Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism. *Trends in microbiology*, 20(5), 251-258.

LUDWIG, W., et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic acids research*, 2004, 32.4: 1363-1371.

LUESKEN, F.A. et al. (2011) *pmoA* Primers for Detection of Anaerobic Methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(11):3877-3880. doi:10.1128/AEM.02960-10.

MEISINGER, D. B., et al. (2007). In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environ. Microbiol.* 9, 1523–1534. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01271.x

MEYERDIERKS, M. K., et al. (2010) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environmental Microbiology*, vol. 12, no. 2, pp. 422–439, 2010.

MILLER, T. L. (2015) *Methanosphaera*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–6.

MINCER, T.J. e AICHER, A. C.. (2013). Production of methanol by a wide phylogenetic array of phytoplankton and implications for epibiont interactions, abstr. 12040. Abstr. ASLO 2013 Aquat. Sci. Meet. Association for the Sciences of Limnology and Oceanography, Waco, TX.

MIYAZAKI, M., et al. (2008). *Amphritea japonica* sp. nov. and *Amphritea balenae* sp. nov., isolated from the sediment adjacent to sperm whale carcasses off Kagoshima, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2815–2820

MONAGHAN, A.J., et al. (2008). Recent variability and trends of Antarctic near-surface temperature. *Journal of Geophysical Research*, 113(D04105): 1-14.

MOU, Y.Z., et al. (2012) *Halohasta litorea* gen. nov. sp. nov., and *Halohasta litchei* sp. nov., isolated from the Daliang aquaculture farm, China and from Deep Lake, Antarctica, respectively. *Extremophiles* (2012) 16: 895. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0485-5>.

MYHRE, G., et al. (2013) Anthropogenic and natural radiative forcing. In: Stocker TF,

Qin D, Plattner G-K et al (eds) Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, vol 8. Cambridge University Press, Cambridge, pp 659–740.

NAKAYAMA, C. R. et al.; (2011) Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Admiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, v. 58, n. 1, p. 128-138, 2011.

NALIN, R. et al. (1999) *Rhodanobacter lindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, 49, 19-23.

NEDZAREK, A. (2008). Sources, diversity and circulation of biogenic compounds in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Antarct. Sci.* 20, 135–145. doi: 10.1017/S0954102007000909.

NEEF, L., VAN WEELE, M. e VAN VELTHOVEN, P. (2010) Optimal estimation of the present-day global methane budget. *Global biogeochemical cycles*, 2010, 24.4.

NELSON, W. C. e STEGEN, J. C. (2015) The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Front. Microbiol.* 6:713. doi: 10.3389/fmicb.2015.00713.

NKAMGA, V. D. e DRANCOURT, M. (2016) *Methanomassiliicoccus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–7.

NORRIS, P. R. (2015). *Acidimicrobiia* class. nov.. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. De Vos, B. Hedlund and S. Dedysh). doi: 10.1002/9781118960608.cbm00003.

NUNORA, T. et al., (2011) Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* 39,3204–3223 (2011). doi: 10.1093/nar/gkq1228; pmid: 21169198

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHLEPER, C. (2013). Archaea in biogeochemical cycles. *Annu. Rev. Microbiol.* 67:437-457.

OCHSENREITER, T., et al. (2003) Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ. Microbiol.* 5:787–97

OREMLAND, R. S.; POLCIN, S. (1982) Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 1270-1276, 1982.

PANTUČEK, R. et al. (2018) *Staphylococcus edaphicus* sp. nov., Isolated in Antarctica, Harbors the *mecC* Gene and Genomic Islands with a Suspected Role in

Adaptation to Extreme Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, n. 2, p. e01746-17, 2018.

PAUL, K. et al. (2012) "Methanoplasmatales," Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:8245–53.

PESSI, I.S. *et al.* (2012) Functional Diversity of Microbial Communities in Soils in the Vicinity of Wanda Glacier, Antarctic Peninsula. *Microbes Environ.* Vol. 27, No. 2, 200–203, 2012 doi:10.1264/jsme2.ME11311.

PESSI, I.S. *et al.* (2015) Distinct composition signatures of archaeal and bacterial phylotypes in the Wanda Glacier fore eld, Antarctic Peninsula. *FEMS Microbiol Ecol.* 2015 Jan;91(1):1-10.

PETITJEAN, C. et al. (2014) Rooting the domain archaea by phylogenomic analysis supports the foundation of the new kingdom Proteoarchaeota. *Genome Biol. Evol.* 7, 191–204 (2014). doi: 10.1093/gbe/evu274; pmid: 25527841.

POL, A. et al. (2007). Methanotrophy below pH1 by a new Verrucomicrobia species. *Nature* 450: 874–U817.

POULSEN, M. et al. (2013) Methylophilic methanogenic Thermoplasmatata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun* 2013;4:1428.

PRAKASH, O. et al. (2012) *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 62, n. 10, p. 2457-2462, 2012

PRAKASH, O., et al. (2013) Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) 97: 51. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4533-y>.

QUAST, C. et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41 (D1): D590-D596

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RAFAEL, L. S. (2015) Cultivo e caracterização de arqueias metanogênicas provenientes de amostras de sedimento marinho nas proximidades da geleira Wanda, Ilha Rei George, Antártica. 71 f. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema.

RAMAKRISHNAN B. *et al.* (2001) Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiol Ecol* 37: 175–186.



RAWLINGS, D. E. (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:65–91.

RAZIN, S., YOGHEY, D. e NAOT, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1094–1156.

REEBURGH, W. S. (2007). Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical reviews*, 107(2), 486-513.

RINKE, C. et al. (2013), Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499, 431–437 (2013). doi: 10.1038/nature12352; pmid: 23851394.

ROOPNARAIN, A. et al. (2017) Biases during DNA extraction affect bacterial and archaeal community profile of anaerobic digestion samples. *3 Biotech*, v. 7, n. 6, p. 375, 2017.

ROSA, K.K. et al. (2009) Feições sedimentológicas e geomorfológicas do ambiente de deglaciação das geleiras Wanda e Ecology, ilha Rei George, Antártica. *Pesquisas em Geociências*, v. 36, p. 315–326, 200.

ROSA, K.K. et al. (2014). Stratigraphy of Wanda Glacier, King George Island, Antarctica, using ground penetrating radar. *Revista Brasileira de Geofísica*. 32. 21. 10.22564/rbgf.v32i1.394.

ROSA, K. K. (2015). Recent changes in the Wanda glacier, King George Island, Antarctica. *Pesquisas em Geociências*. 42. 187-196.

ROSELINE, T. L. e SACHINDRA, N. M. (2016) Characterization of extracellular agarase production by *Acinetobacter junii* PS12B, isolated from marine sediments. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 6, p. 219-226, 2016.

ROTHER, O. e THOMM, M. (2000) A simplified method for the cultivation of extreme anaerobic Archaea based on the use of sodium sulfite as reducing agent. *Extremophiles* (2000) 4: 247. <https://doi.org/10.1007/PL00010716>.

RUSCH, D. B., et al. (2007). The sorcerer II global ocean sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol.* 5:e77. doi: 10.1371/journal.pbio.005007.

SAHADE, R. et al. (2015) Climate change and glacier retreat drive shifts in an Antarctic benthic ecosystem. *Science advances*, 2015, 1.10: e1500050.

SAIT, M., DAVIS, K. E. R., e JANSSEN, P. H. (2006). Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1852–1857. doi: 10.1128/AEM.72.3.1852-1857.2006

SÁNCHEZ-OSUNA, M.; BARBÉ, J. e ERILL, I. (2017) Comparative genomics of the DNA-damage inducible network in the Patescibacteria. *Environmental microbiology*, 2017.

SALA, M.M., et al. (2008) Metabolic diversity of heterotrophic bacterioplankton over winter and spring in the coastal Arctic Ocean. *Environ. Microbiol.* 10:942–949.

SAKAI, S. *et al.* (2009). Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4892–4896. doi: 10.1128/AEM.02835-08

SCHATTENHOFER, M., et al. (2009). Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 11, 2078–2093. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01929.x

SCHINK B. e ZEIKUS, J. G. (1982). Microbial ecology of pectin decomposition in anoxic lake sediments. *J. Gen. Microbiol.* 128:393–404.

SCHLEPER, C., JURGENS, G. e JONUSCHEIT, M. 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:479–88.

SEITZ, K. W. (2016) Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction. *ISME J.* 10, 1696–1705 (2016). doi: 10.1038/ismej.2015.233; pmid: 26824177.

SEKIGUCHI, Y. (2006). Yet-to-be cultured microorganisms relevant to methane fermentation processes. *Microbes Environ.* 21, 1–15. doi: 10.1264/jsme2.21.1.

SEONG, C. N. et al. (2018) Taxonomic hierarchy of the phylum Firmicutes and novel Firmicutes species originated from various environments in Korea. *Journal of Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 1-10, 2018.

SINGH, H. B. et al. (1996). Low ozone in the marine boundary layer of the tropical Pacific Ocean: Photochemical loss, chlorine atoms and entrainment. *Journal of Geophysical Research*, 101:1907-1917.

SINGH, O. V.; HARVEY, S. P. (2010) *Sustainable Biotechnology*. Dordrecht: Springer; 2010.

SINGH, N. et al. (2005) Isolation and characterization of methylotrophic methanogens from anoxic marine sediments in Skan Bay, Alaska: description of *Methanococcoides alaskense* sp. nov., and emended description of *Methanosarcina baltica*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 6, p. 2531-2538, 2005.

SKENNERTON, C. T. et al. (2016) Phylogenomic analysis of Candidatus 'Izimaplasma' species: free-living representatives from a Tenericutes clade found in methane seeps. *The ISME journal*, v. 10, n. 11, p. 2679, 2016.

SONG, J., et al. (2009) Improved culturability of SAR11 strains in dilution-to-extinction culturing from the East Sea, West Pacific Ocean. *FEMS Microbiol Lett* 295:141–147.

SOWERS K. R. (2015) *Methanococcoides*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–4.

SPANG, A. et al., (2015) Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179 (2015). doi: 10.1038/nature14447; pmid: 25945739

SPANG, A., CACERES, E. F. e ETTEMA, T. J. (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science*, 357(6351).

SPRENGER, W.W. et al. (2000) *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1989–1999.

STEINBERG, L. M. e REGAN, J. M. (2008) Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 21, p. 6663-6671, 2008.

STILES M. E.; HOLZAPFEL, W. H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 1997;36(1):1–29.

STEWART, E. J. (2012) Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* 194:4151–4160.

TAKII, S. et al. (2007) *Dethiosulfatibacter aminovorans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-reducing bacterium isolated from coastal marine sediment via sulfate-reducing enrichment with Casamino acids. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 57, n. 10, p. 2320-2326, 2007.

TEELING, H, et al. (2012) Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science* 336:608–611

TESKE, A e SØRENSEN, KB. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: Have we caught them all? *ISME J.* 2:3–18.

THAUER, R.K. et al. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 579–591.

THEISS, J., ROTHER, M. e RÖSKE, K. (2016) Influence of DNA isolation method on the investigation of archaeal diversity and abundance in biogas plants. *Archives of microbiology*, v. 198, n. 7, p. 619-628, 2016.

THIJS, S., et al.(2017) Comparative Evaluation of Four Bacteria-Specific Primer Pairs for 16S rRNA Gene Surveys. *Front. Microbiol.* 8:494. doi: 10.3389/fmicb.2017.00494.

TICAK, T., et al. (2015) Isolation and characterization of a tetramethylammonium-degrading *Methanococcoides* strain and a novel glycine betaine-utilizing *Methanlobus* strain. Arch Microbiol (2015) 197: 197. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1043-6>.

TIMMERS, P. et al. (2017) Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea. Archaea, v. 2017, 2017.

TROSHINA, O. et al. (2015) *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 65, n. 12, p. 4315-4322, 2015.

TOFFIN, L., et al. (2004) Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. FEMS Microbiol Ecol 48: 357–367.

UJOR, V., et al. (2015) Allopurinol-mediated lignocellulose-derived microbial inhibitor tolerance by *Clostridium beijerinckii* during acetone–butanol– ethanol (ABE) fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 99: 3729–3740.

USSIRI, D. e RATTAN, L. (2017). Historical and Contemporary Global Methane Cycling. In: Carbon Sequestration for Climate Change Mitigation and Adaptation. Springer International Publishing, 2017. p. 227-285.

VANWONTERGHEM, I. et al., (2016) Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. Nat. Microbiol. 1, 16170 (2016). doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.170; pmid: 2769480.

WADHAM, J. L. et al. Potential methane reservoirs beneath Antarctica. Nature, v. 488, n. 7413, p. 633-637, 2012.

WALLNER, G., AMANN, R., BEISKER, W. (1992) Optimizing Fluorescent In Situ Hybridization With rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms. Cytometry 14:136-143.

WANG, X.-C. e LEE, C. (1990) The distribution and adsorption behavior of aliphatic amines in marine and lacustrine sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 54, 2759-2774.

WANG, B., et al. (2015). *Brassicibacter thermophilus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from coastal sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 2870–2874. doi: 10.1099/ijso.0.000348

WANG, L., et al. (2017) Bacterial community structure in intertidal sediments of Fildes Peninsula, maritime Antarctica 40: 339. <https://doi-org.ez69.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00300-016-1958-2>.

WARD, N. L. et al. (2009) Three genomes from the phylum Acidobacteria provide

insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 2046–2056. doi: 10.1128/AEM.02294-08 PMID: 19201974.

WATKINS, A. J. et al. (2012) Choline and N, N-dimethylethanolamine as direct substrates for methanogens. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 23, p. 8298–8303, 2012.

WIECHERT, U.H. (2002) Earth's early atmosphere. *Science* 298, 2341–2342.

WILLIAMS, T. J. et al. (2009) Global proteomic analysis of the insoluble, soluble, and supernatant fractions of the psychrophilic archaeon *Methanococcoides burtonii* part I: the effect of growth temperature. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 2, p. 640–652, 2009.

WILLIAMS, T. A. et al., (2017) Integrative modeling of gene and genome evolution roots the archaeal tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E4602–E4611 (2017). doi: 10.1073/pnas.1618463114; pmid: 28533395.

WMO (2016) World Meteorological Organization (WMO) greenhouse gas bulletin: The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observation through 2015. Bulletin No. 12. World Meteorological Organization (WMO), Global Atmosphere Watch (GAW), Geneva, Switzerland, 8 pp.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 5088–5090.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 4576–4579.

WOLIN, M.J., (1981). Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science* 213, 1463–1468.

WRIGHTON, K.C. et al. (2012) Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science* 337, 1661–1665 (2012).

WYNN-WILLIAMS, D. D. (1996) Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. *Biodiversity & Conservation*, 1996, 5.11: 1271–1293.

YAMADA, T.; et al. (2006) *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(pt 6):1331–1340.

YANAGAWA, K. et al. (2016) Biogeochemical cycle of methanol in anoxic deep-sea sediments. *Microbes and environments*, v. 31, n. 2, p. 190–193, 2016.

YILMAZ, P. et al. (2016) Expanding the World of Marine Bacterial and Archaeal Clades. *Front. Microbiol.* 6:1524. doi: 10.3389/fmicb.2015.01524

ZAREMBA-NIEDZWIEZKA, K. et al., (2017) Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 541, 353–358 (2017). doi: 10.1038/nature21031; pmid: 28077874.

ZENGLER K., et al. (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15681–15686.

ZENGLER, K. e PALSOON, B.O. (2012) A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nat Rev Microbiol* 10: 366–372.

ZHANG, B. et al. (2016) The diversity and biogeography of the communities of Actinobacteria in the forelands of glaciers at a continental scale. *Environmental Research Letters*, v. 11, n. 5, p. 054012, 2016.

ZHANG, J.; et al. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal Genetic Genomics*, v. 38, n. 3, p. 95-109, 2011.

ZHAO, S. et al. *Actinotalea suaedae* sp. nov., isolated from the halophyte *Suaeda physophora* in Xinjiang, Northwest China. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 107, n. 1, p. 1-7, 2015.

ZHU, R. et al. (2009) Carbon dioxide and methane fluxes in the littoral zones of two lakes, east Antarctica. *Atmospheric Environment*, v. 44, n. 3, p. 304-311, 2010.

ZHU, B. et al. (2009) Characteristics and biogas production potential of municipal solid wastes pretreated with a rotary drum reactor. *Bioresour. Technol.* 100, 1122–1129.

ZHUANG, G.-C., et al. (2011) Production of DMS and DMSP in different physiological stages and salinity conditions in two marine algae. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 29, 369-377.

ZHUANG, G.-C., et al.. (2014) Gas chromatographic analysis of methanol and ethanol in marine sediment pore waters: Validation and implementation of three pretreatment techniques. *Mar. Chem.* 160:82–90.

ZHUANG, G.-C., et al. (2017) Distribution and isotopic composition of trimethylamine, dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate in marine sediments. *Mar. Chem.* 196, 35-46.3

ZHUANG, G-C et al. (2018). Relative importance of methylotrophic methanogenesis in sediments of the Western Mediterranean Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 224, 171-186, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2017.12.024>.

ZINDER, S.H. (1993). Physiological ecology of methanogens. In *Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics*. Edited by J.G. Ferry. Chapman and Hall, New York. pp.

ZINGER, L., et al. et al. (2011). Global patterns of bacterial beta- diversity in seafloor

and seawater ecosystems. *PLoS ONE* 6:e24570. doi: 10.1371/journal.pone.0024570.

ZOUCH, H. et al. (2017) Microbial Diversity in Sulfate-Reducing Marine Sediment Enrichment Cultures Associated with Anaerobic Biotransformation of Coastal Stockpiled Phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Front. Microbiol.* 8:1583. doi: 10.3389/fmicb.2017.01583.

## APÊNDICES

### Apêndice A - Cálculo da concentração de metano na atmosfera do frasco de cultivo

(1) Para calcular a concentração de metano, é necessário calcular primeiramente a concentração molar padrão, para tal, utiliza-se o volume molar universal:

$$C_{padr\tilde{a}o} = \frac{V_{injetado} \times p}{V_{molar}}$$

Onde:

$$V_{injetado} = 1 \times 10^{-4} \text{ L}$$

p: pureza do gás (0,995)

$$V_{molar} = 22,4 \text{ L}$$

Portanto,  $C_{padr\tilde{a}o} = 0,004441964 \text{ mol/L}$  ou  $4,441964 \text{ mmoles/L}$

(2) O cálculo da concentração de metano (mmoles/L) é realizado da seguinte forma:

$$C_{metano} = \frac{A_{amostra} \times C_{padr\tilde{a}o}}{A_{padr\tilde{a}o}}$$

Onde:

$C_{metano}$ : concentração de metano (mmoles/L)

$A_{amostra}$ : área da amostra

$A_{padr\tilde{a}o}$ : área do padrão

$C_{padr\tilde{a}o}$ : Concentração molar padrão (4,441964 mmoles/L)



## ANEXOS

### Anexo A - Composição da solução traço de metais

Reagentes	Quantidade
Ácido nitriloacético	1,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,556 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,24 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,24 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,15 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01 g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,01 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g
Água Milli-Q	1000 mL

**Anexo B - Composição da solução de vitaminas**

Reagentes	Quantidade
Biotina	0,002 g
Ácido fólico	0,002 g
Tiamina.HCl	0,005 g
Riboflavina	0,005 g
Ácido nicotínico	0,005 g
Pantetonato de cálcio	0,005 g
Piridoxina.HCl	0,010 g
Vitamina B12	0,0001 g
Ácido lipólico (tióico)	0,005 g
Água Milli-Q	1000 mL